

Prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à l’Amodiaquine au Tchad.

Rapport Final

28 Décembre 2018

Par : Abdoulaye Djimdé, PharmD, PhD, Professeur Agrégé de Parasitologie-Mycologie
Chef, Molecular Epidemiology and Drug Resistance Unit,
Malaria Research & Training Center (MRTC)
Département d’Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP)
Faculté de Médecine et d’Odontostomatologie (FMOS), Faculté de Pharmacie (FAPH),
Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), BP 1805 Bamako, Mali
Téléphone : (223)20-22-81-09/Cel : (223) 66-74-42-80
Email : adjimde@icermali.org

Sponsor : PNLP Tchad

Contenu

| | |
|---|----------------------|
| Abréviations | iii |
| 1. Introduction..... | 1 |
| 2. Formation..... | 1 |
| 3. Sélection des confettis à analyser..... | 2 |
| 4. Analyses moléculaires des marqueurs de résistance à la SP et à l'AQ..... | 3 |
| 5. Analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13 | 38 |
| 6. Analyse du diagnostic moléculaire du paludisme | 40 |
| 7. Gestion et analyse des données..... | 42 |
| 8. Résultats | 443 |
| 9. Discussion..... | 57. |
| 10. Conclusion..... | 58 |
| 11. References..... | 59 |
| 11. Annexes..... | 6060 |

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AQ : Amodiaquine

BB : Bleu de Bromophénol

CTA : Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

DEAP: Département épidémiologique des affections parasitaires

dNTP: Désoxy Nucléotide Triphosphate

EDTA: Ethyl-diamine trichloro-acétate

ENIPT: Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad

MEDRU: Molecular Epidemiology and Drug resistance Unit

MON: Modes opératoires normalisés

MRTC: Malaria Research and Training Center

Pb : Paire de bases

PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

Pfcr: *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

Pfdhfr : *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Réductase

Pfdhps : *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthétase

Pfmdr1: *Plasmodium falciparum* multi-drug resistant

qPCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative

SP : Sulfadoxine Pyriméthamine

Taq polymérase: *Thermus aquaticus* polymérase

TBE: Tris-borate d'EDTA

USTTB: L'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

1. Introduction

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique, particulièrement en Afrique au sud du Sahara. L'une des principales composantes pour la prise en charge des cas, le contrôle et l'élimination du paludisme est le prompt traitement avec des médicaments antipaludiques. Pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande le traitement préventif intermittent (TPIg) avec la sulfadoxine pyriméthamine. L'OMS recommande également la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) avec la sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine chez les enfants dans les zones Sahéliennes. Une bonne utilisation de ces médicaments antipaludiques nécessite une connaissance de leur efficacité sur l'ensemble des zones d'endémie palustre. Pour une surveillance de l'efficacité des antipaludiques à large échelle, la méthode la plus simple et la mieux recommandée est l'évaluation des marqueurs moléculaires de résistance aux différentes molécules.

Dans le cadre de son Enquête Nationale sur les Indicateurs du Paludisme au Tchad de 2017 le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a entrepris une enquête transversale de la prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'amodiaquine sur l'ensemble du territoire du Tchad . L'analyse moléculaire des confettis prélevés lors de l'enquête a été confiée à l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de Chimiorésistance (MEDRU) du Malaria Research and Training Center (MRTC), Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali. En plus de l'analyse proprement dite et dans le souci de transfert de technologie, il a été jugé nécessaire qu'un agent technique du laboratoire du PNLN du Tchad se rende au Mali pour apprendre l'ensemble de la Technologie durant l'analyse des confettis du PNLN-Tchad.

Le présent rapport final décrit les volets transfert de technologie et analyse moléculaires des prélèvements de confettis envoyés au Mali.

2. Formation

Mr. Batrane Adam a été désigné par le PNLN – Tchad pour une formation de 2 mois. La formation s'est faite en deux étapes : une étape théorique et une étape pratique. L'étape théorique consistait à faire un rappel sur la biologie moléculaire et à passer en revue l'ensemble des modes opératoires normalisés (MON) des étapes de la réaction de

polymérisation en chaîne (PCR). L'apprenant a fait de nombreuses lectures et un exposé en rapport avec son sujet de stage.

A l'issue d'une évaluation après 45 jours de séjour au Mali il s'avérait nécessaire de prolonger le séjour de M. Batrane afin d'approfondir sa formation. Le stage dura 5 mois (Mai – Septembre 2018).

Durant sa formation, M. Batrane a fait preuve d'un engagement total, d'une grande curiosité et d'une assiduité exemplaires. Il était devenu un membre à part entière de l'équipe de Biologie Moléculaire en charge de ces analyses.

Les compétences suivantes ont été acquises par M. Batrane :

1/L'extraction de l'ADN (Acide désoxyribo nucléique) à partir des confettis par les méthodes du Méthanol, du Chelex et de Qiagen

2/Les amplifications en PCR 1 et PCR 2

3/La révélation sur gel d'agarose

4/L'interprétation des résultats

5/La saisie des résultats sur une base de données

A la fin de la formation, l'apprenant a rédigé un rapport de stage.

3. Sélection des confettis à analyser

En fonction des objectifs de l'étude tels que décrits par le PNLP-Tchad et en présence de M. Batrane, nous avons convenu du choix des confettis à analyser. Ces confettis une fois entièrement analysés permettront d'avoir des données couvrant les différentes Régions du Tchad ainsi que les principales populations cibles. Un tri aléatoire du nombre de confettis par Région, groupe d'âge et population cible a été effectué à l'aide de SPSS 16.0. Au total 2208 confettis ont été sélectionnés pour les analyses moléculaires des marqueurs de résistance à la SP, à l'AQ et au diagnostic des espèces plasmodiales. Un autre tri aléatoire a permis de choisir 201 confettis pour l'analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13.

4. Analyses moléculaires des marqueurs de résistance à la SP et à l'AQ.

4.1. Extraction de l'ADN plasmidial

▪ Matériels et réactifs

Blouse, paire de gants, paire de ciseaux, papier hygiénique, confettis, marqueur indélébile, racks, tubes eppendorf, Becher, poubelle, pipette (100, 200, 1000), embout (100, 200, 1000), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, Cat # QGN-51306), plaque chauffante, Bain-marie, Vortex, thermomètre, congélateur.

▪ Mode opératoire

L'extraction de l'ADN plasmidial a été faite à l'aide du Kit QIAGEN. Cette extraction consiste à ;

- Découper approximativement 3 mm² de confettis imprégnés de sang, le transférer dans un microtube de 1,5 ml, puis ajouter 180 µl de Buffer ATL et incuber à 85°C pendant 10 minutes. Puis centrifuger brièvement.
- Ajouter 20 µl de Protéinase K, mélanger à l'aide du vortex, et incuber à 56°C pendant une heure. Puis centrifuger brièvement.
- Ajouter 200 µl de Buffer AL puis mélanger bien à l'aide du vortex, et incuber à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) puis mélanger bien à l'aide du vortex. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes qui se trouvent à l'intérieur du couvercle du tube.
- Transférer soigneusement le mélange dans une colonne QIAamp, fermer la colonne puis centrifuger à 8 000 rpm (Tours par minute) pendant 1 minute.
- Placer la colonne dans un nouveau tube de collection, soigneusement ouvrir la colonne ajouter 500 µl de Buffer AW1, fermer la colonne puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.

- Placer la colonne dans un nouveau tube de collection, soigneusement ouvrir la colonne ajouter 500 µl de Buffer AW2, fermer la colonne puis centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.
- Placer la colonne dans un nouveau tube de collection puis centrifuger à 14 000 rpm pendant 1 minute.
- Placer la colonne dans un tube pré labellisé de 1,5 ml puis ajouter 150 µl de Buffer AE, incubé à la température ambiante du labo pendant 1 minute puis centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 minute.
- Garder l'ADN plasmidial à – 20°C.

4.2. Amplification et revelation de l'ADN plasmidial

- **Principe**

Une double amplification (double PCR = Nested-PCR ou PCR nichée) d'une portion du gène susceptible de comporter la mutation cible est tout d'abord réalisée ; le produit de la première amplification étant utilisé pour effectuer la seconde. L'ADN extrait des confettis étant de faible quantité, la PCR nichée permet d'obtenir des produits de PCR détectable sur gel d'agarose. A chaque PCR, des amorces spécifiques à la portion qui contient le point de mutation sont utilisées. Les génotypes des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* et *Pfmdr1* sont ensuite déterminés par restriction enzymatique au niveau des codons 51, 59 et 108 pour *Pfdhfr*, 437 et 540 pour *Pfdhps*, 76 pour *Pfcrt* et 86 pour *Pfmdr1*.

- **Echantillon**

Les échantillons sont constitués de l'ADN extrait des confettis au Qiagen.

Témoins positifs du codon sauvage : 3D7 pour *Pfdhfr*

Témoins positifs du codon mutant : V1S pour *Pfdhfr*

Témoins positifs du codon sauvage : PM pour *Pfdhps*

Témoins positifs du codon mutant : PP pour *Pfdhps*

Témoins positifs du codon sauvage : 3D7 pour *Pfcrt* et *Pfmdr1*

Témoins positifs du codon mutant : Dd2 pour *Pfprt* et *Pfmdr1*

▪ **Matériels**

Blouse, gants, marqueur indélébile, tubes de 200 µl ou 500 µl et 1500 µl, pipettes (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000 µl) embout (2 ; 10 ; 20 ; 100 ; 200 et 1000 µl), racks, portoirs pour pipettes, thermocycleur, bac de migration, moule et peigne à gel, scotch à papier, para-film, cahier de paillasse, stylos, centrifugeuse électrique, balance pèse produit, erlenmeyer, appareil photo UV, film polaroid 667, éprouvette graduée de 100 ml, spectrophotomètre, hotte, réfrigérateur-congélateur, incubateur, poubelle.

▪ **Préparation des réactifs de PCR**

□ **DNTPs** : Une solution de travail équimolaire des quatre dNTPs (désoxy Nucléotide Triphosphate) de 2mM était préparée à partir d'un stock de 100mM (Cat # INV-10297018).

□ **Solution tampon (PCR Buffer)** : Concentrées à 10X sans Mg²⁺ (Cat # SIG-P2317-1.5ML), elles étaient fournies par les compagnies commerciales ainsi que le Mg²⁺ (CAL-442611-100GM). Pour le stock de travail, on préparait les aliquotes de 5X avec une teneur de 7,5 mM MgCl₂, 12,5mM MgCl₂ et 17,5mM MgCl₂.

□ **Amorces (Primers)**: Elles venaient de la compagnie Inqaba® sous forme de poudre (lyophilisée), à partir de la poudre, le stock de travail 100 µM (ou 100 X) était préparé; la concentration finale dans le tube réactionnel était de 1µM.

□ **TBE (Tris Borate EDTA)**: Pour constituer une solution de stock de travail d'un litre avec une concentration de 5 fois ou 5X et avec un pH=8. On prenait 54g de Tris base (89mM) (RAD-1610719) ; 27,5g d'acide borique (89mM) (SIG-B6768-1KG) ; et 0,37g d'EDTA (Ethyl-diamine trichloro-acétate) Na (2mM) (SIG-E6758-100G), pour dissoudre dans un litre d'eau de-ionisée. La solution finale était 0,5 fois concentrée soit 0,5X.

□ **Solution de migration**:

Elle était constituée du TBE à une concentration de 0,5X.

□ **Colorants de migration**: Il s'agit du bleu de bromophénol (BB). Pour préparer on prenait 35ml de glycérol, 15ml d'eau de-ionisée et 0.125g de bleu de bromophénol.

Gel de migration:

Il est fait à partir de 2 g de poudre d'agarose dissoute dans 100ml de TBE à 0,5X. La solution est ensuite chauffée dans un four à micro-onde pendant 3 min, permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après le chauffage, on y ajoute du Red Gel (3ul), puis le gel est coulé dans le moule de migration contenant les peignes. Au bout de 30 min, le gel est prêt à être utilisé pour la migration.

Le Red Gel:

C'est un produit qui va s'intercaler entre les brins d'ADN et les rend fluorescent à la lumière ultra violette.

Marqueur de poids moléculaire:

Ce marqueur de poids moléculaires (NEB-N3231S) constituait la solution de référence. Pour la résuspension, on dilue 100µl de paires de bases de l'ADN dans 400µl d'eau stérile. Puis, ajouter 100µl du colorant bleu six fois concentré, pour former un mélange de 600µl.

4.2.1. Les techniques

Nous avons procédé à l'amplification d'un fragment des gènes *DHFR* N51I, C59R et S108N, *DHPS* A437G et K540E, *Pfcrf76* et *Pfmdr1*.

a) Détermination du génotype des codons 51, 59 & 108 (*DHFR Triple*) [1,2]

▪ Première amplification :

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction;
- Repartir dans chaque tube identifié 20 µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 5µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant;
- Centrifuger brièvement les tubes;

□ Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

Couples d'amorces de la première amplification :

FR519-A : GCGCGCTAATAACTACACATTTA

FR519-B : CCCGGGCTCTTATATTTCAATTT

Tableau I: Mélange réactionnel de la première amplification pour un volume final de 25 µl:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en µl |
|---------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|
| H ₂ O | - | - | 11,875 |
| Buffer/ Mgcl ₂ | 5X/ 12,5 mM | 1X/ 2,5 mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 µM | 2,5 |
| 100X FR519-A | 100 µM | 1 µM | 0,25 |
| 100X FR519-B | 100 µM | 1 µM | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U /µl | 0,025U | 0,125 |
| Volume Total | | | 20 µl |

On ajoute dans chaque tube **5 µl de l'ADN extrait au Qiagen.**

Tableau II: Programme de la première amplification de *Dhfr 59*

| Etapes | Température | Temps |
|-------------------------|-------------|---------|
| 1 Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 Dissociation | 92°C | 30 secs |

| | | | |
|---|--------------------------------|------|---------|
| 3 | Association | 45°C | 30 secs |
| 4 | Elongation | 65°C | 45 secs |
| 5 | Retourner à l'étape 2, 44 fois | | |
| 6 | Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 | Fin du programme | 4°C | Infini |

▪ **Deuxième amplification :**

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous;
- Repartir dans chaque tube identifié 24µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 1 µl de l'ADN du produit de la première amplification dans le tube correspondant;
- Centrifuger brièvement les tubes;
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié;
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%;
- Faire la photo du gel.

Couple d'amorces de la deuxième amplification :

FR51-D : CTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGGA

FR59-D : ATTTTTCATATTTTGATTCATTCACATATGTTGTAAGTGTAC

La taille attendue pour les produits de PCR est de 113 pb.

Tableau III: Mélange réactionnel de la deuxième amplification pour un volume final de 25 μ l:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en μ l |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | - | - | 15,875 |
| Buffer/ Mgcl ₂ | 5X/ 12,5 mM | 1X/ 2,5mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 μ M | 2.5 |
| 100X FR51-D | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| 100X FR59-D | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U/ μ l | 0,025U | 0,125 |
| Volume Total | | | 24 μl |

On ajoute dans chaque tube **1 μ l du produit de la première amplification.**

Tableau IV: Programme de la deuxième amplification de *Dhfr 59*

| Etapes | Température | Temps |
|----------------------------------|-------------|---------|
| 1 Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 Dissociation | 92°C | 30 secs |
| 3 Association | 45°C | 30 secs |
| 4 Elongation | 65°C | 30 secs |
| 5 Retourner à l'étape 2, 19 fois | | |
| 6 Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 Fin du programme | 4°C | Infini |

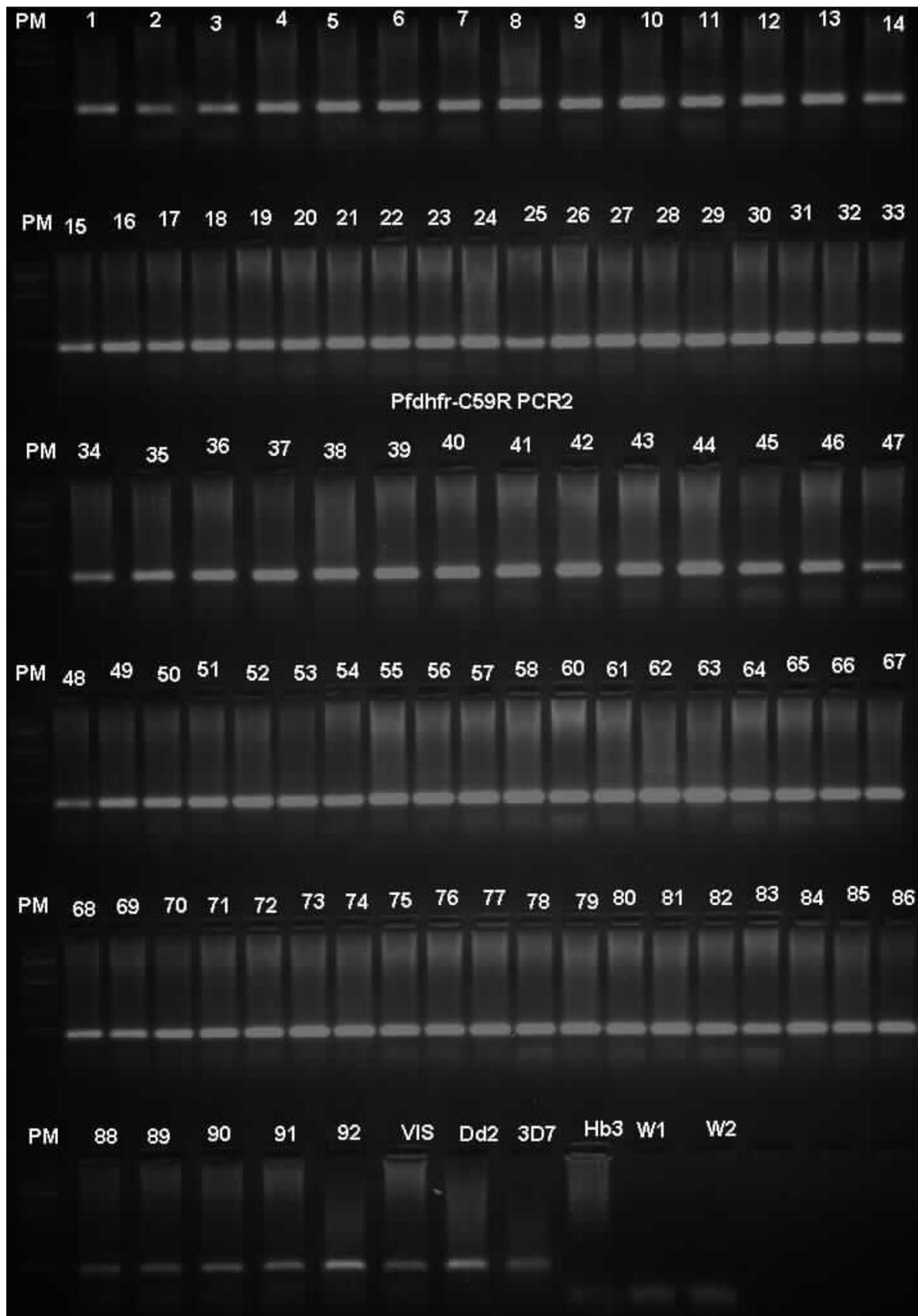


Figure 1: Gel PCR2 *Pfdhps* 519 ENIPT

▪ **Restriction enzymatique**

Elle concerne les échantillons positifs de la 2^{ème} amplification :

- Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons;
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (tableau V);
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel;
- Ajouter 5 µl du produit de la deuxième amplification dans les tubes correspondant et les fermer;
- Mettre en incubation dans un thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 37 °C pour l'enzyme BsrGI pendant 30 min au minimum ou toute la nuit;
- Enlever les tubes du thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2%;
- Faire la photo du gel.

Tableau V: Composition du Mélange réactionnel de la digestion

| Réactifs | Volume par réaction |
|------------------|---------------------|
| H ₂ O | 12,6 µl |
| 10X NEBuffer 2.1 | 2 µl |
| BsrGI | 0,4 µl |
| Total | 15 µl |

Ajouter dans chaque tube **5µl du produit de la deuxième amplification.**

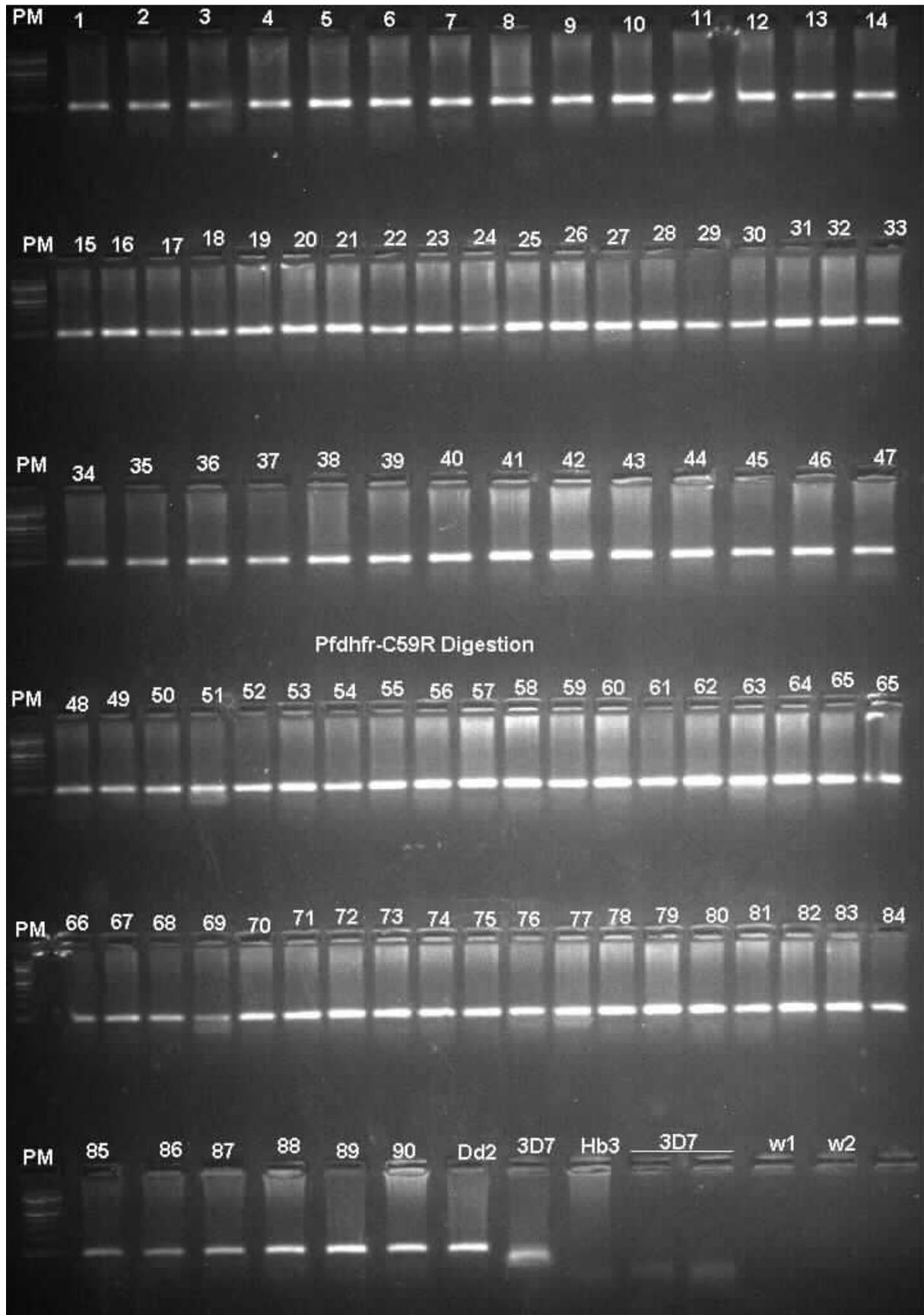


Figure 2: Gel digestion *Pfdhps* 519 ENIPT

▪ **Interprétation et validation des résultats :**

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

1) Conformité de la taille du produit de la digestion par rapport à celle attendue;

- ✓ L'enzyme de restriction utilisée BsrGI coupe les souches de génotypes sensibles en 65 et 36 bp.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sensible correspondent aux souches sensible.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspondent aux souches résistantes.
- ✓ Un échantillon est considéré comme mixte quand il présente à la fois une bande correspondant au sensible et une bande correspondant au résistant.

2) L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.

b) Détermination du génotype des codons 437 et 540 au niveau de *Dhps* [1,2]

▪ **Première amplification :**

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction;
- Repartir dans chaque tube identifié 20 µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 5 µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant;
- Centrifuger brièvement les tubes;

□ Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

Couples d'amorces de la première amplification :

Amorces spécifiques au codon 437 :

Amorce sens PS400-A : GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT

Amorce anti-sens PS400-B : GGGGTCACATTTAACAATTTTATT

Amorces spécifiques au codon 540 :

Amorce sens PS500-A : GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG

Amorce anti-sens PS500-B : GGCCGGTGGATACTCATCATATA

Tableau VI: Mélange réactionnel de la première amplification pour un volume final de 25 μ l:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en μ l |
|----------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | - | - | 11,875 |
| Buffer / Mgcl ₂ | 5X/ 17,5 mM | 3,5 mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 μ M | 2,5 |
| 100X Amorce A | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| 100X Amorce B | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U / μ l | 0,05 | 0.125 |
| Volume Total | | | 20 μ l |

Ajouter dans chaque tube **5 μ l de l'ADN extrait au Qiagen.**

Tableau VII: Programme de la première amplification de *Dhps 437 et 540*

| Etapes | Température | Temps |
|--------|-------------|-------|
|--------|-------------|-------|

| | | | |
|---|--------------------------------|------|---------|
| 1 | Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 | Dissociation | 92°C | 30 secs |
| 3 | Association | 45°C | 30 secs |
| 4 | Elongation | 65°C | 45 secs |
| 5 | Retourner à l'étape 2, 44 fois | | |
| 6 | Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 | Fin du programme | 4°C | Infini |

▪ **Deuxième amplification :**

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous;
- Repartir dans chaque tube identifié 24µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 1 µl de l'ADN du produit de la première amplification dans le tube correspondant;
- Centrifuger brièvement les tubes;
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié;
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%;
- Faire la photo du gel.

Couple d'amorces de la deuxième amplification:

Amorces spécifiques au codon 437 :

Amorce sens : PS400-D1 : TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA

Amorce anti-sens : PS400-D2 : CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT

La taille attendue pour les produits de PCR est de 150 pb.

Amorces spécifiques au codon 540 :

Amorce sens : **PS500-D1** : GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG

Amorce anti-sens : **PS500-D2** : CGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC

La taille attendue pour les produits de PCR est de 210 pb.

Tableau VIII: Mélange réactionnel de la deuxième amplification pour un volume final de 25 μ l:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en μ l |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | - | - | 15,875 |
| Buffer/ Mgcl ₂ | 5X/ 7.5 mM | 1X/ 1,5 mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 μ M | 2,5 |
| 100X Amorce D1 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| 100X Amorce D2 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U / μ l | 0,05 | 0.125 |
| Volume Total | | | 20 μ l |

On ajoute dans chaque tube **1 μ l du produit de la première amplification.**

Tableau IX: Programme de la deuxième amplification de *Dhps 437 et 540*

| Etapes | Température | Temps |
|----------------------------------|-------------|---------|
| 1 Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 Dissociation | 92°C | 30 secs |
| 3 Association | 45°C | 30 secs |
| 4 Elongation | 65°C | 45 secs |
| 5 Retourner à l'étape 2, 19 fois | | |

| | | |
|---------------------|------|--------|
| 6 Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 Fin du programme | 4°C | infini |

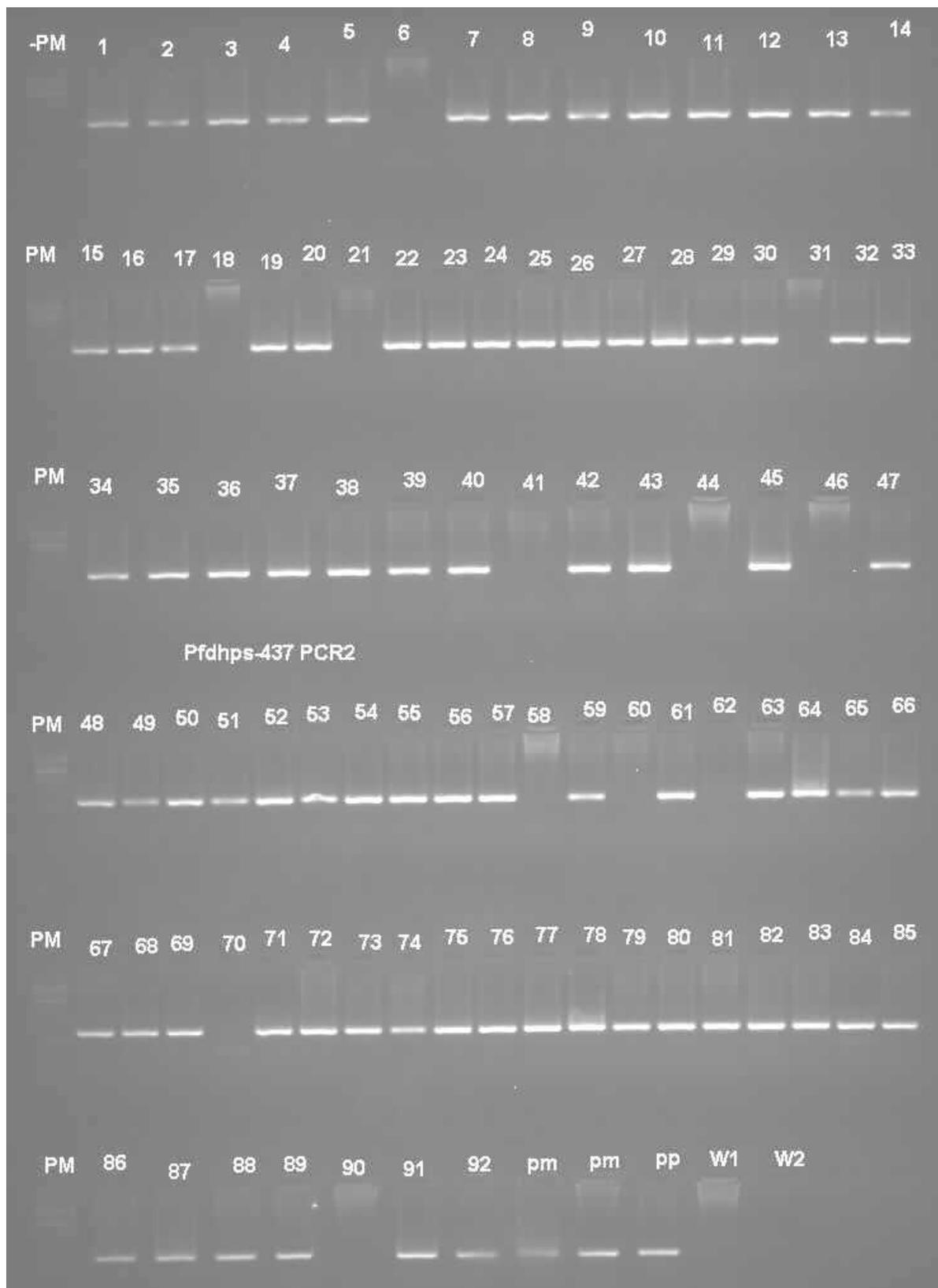


Figure 3: Gel PCR2 *Pfdhps* 437 ENIPT

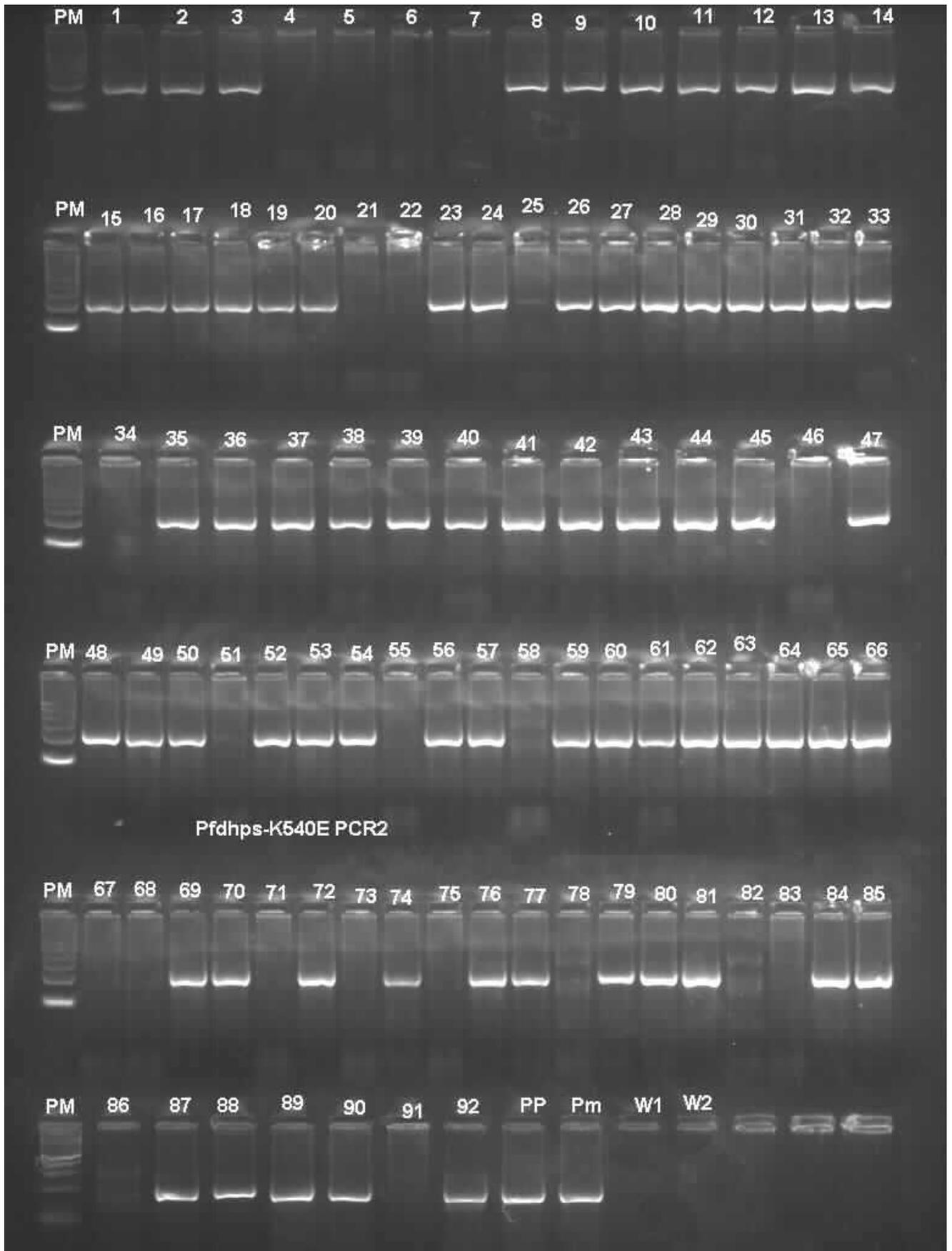


Figure 4: Gel PCR2 *Pfdhps* 540 ENIPT

▪ **Restriction enzymatique**

Digestion enzymatique du produit de la 2^{ème} amplification :

- Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons ;
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (tableau X) ;
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel ;
- Ajouter 5 µl du produit de la 2^{ème} amplification dans les tubes correspondant et les fermer ;
- Mettre en incubation dans un thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 37°C pour les enzymes AVA II et FOK I respectivement pour Dhps 437 et 540 pendant 30 minutes au minimum ou durant toute la nuit ;
- Enlever les tubes du thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur ;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2% ;
- Faire la photo du gel.

Tableau X: Composition du Mélange réactionnel de la digestion

| Réactifs | Volume par réaction | |
|------------------|---------------------|-------------------|
| | <i>PfDhps 437</i> | <i>PfDhps 540</i> |
| H ₂ O | 12,6 | 12,6 |
| CutSmart | 2 | 2 |
| AVA II | 0,4 | - |
| FOK I | - | 0,4 |
| Total | 15 | 15 |

Ajouter dans chaque tube **5µl du produit de la deuxième amplification.**

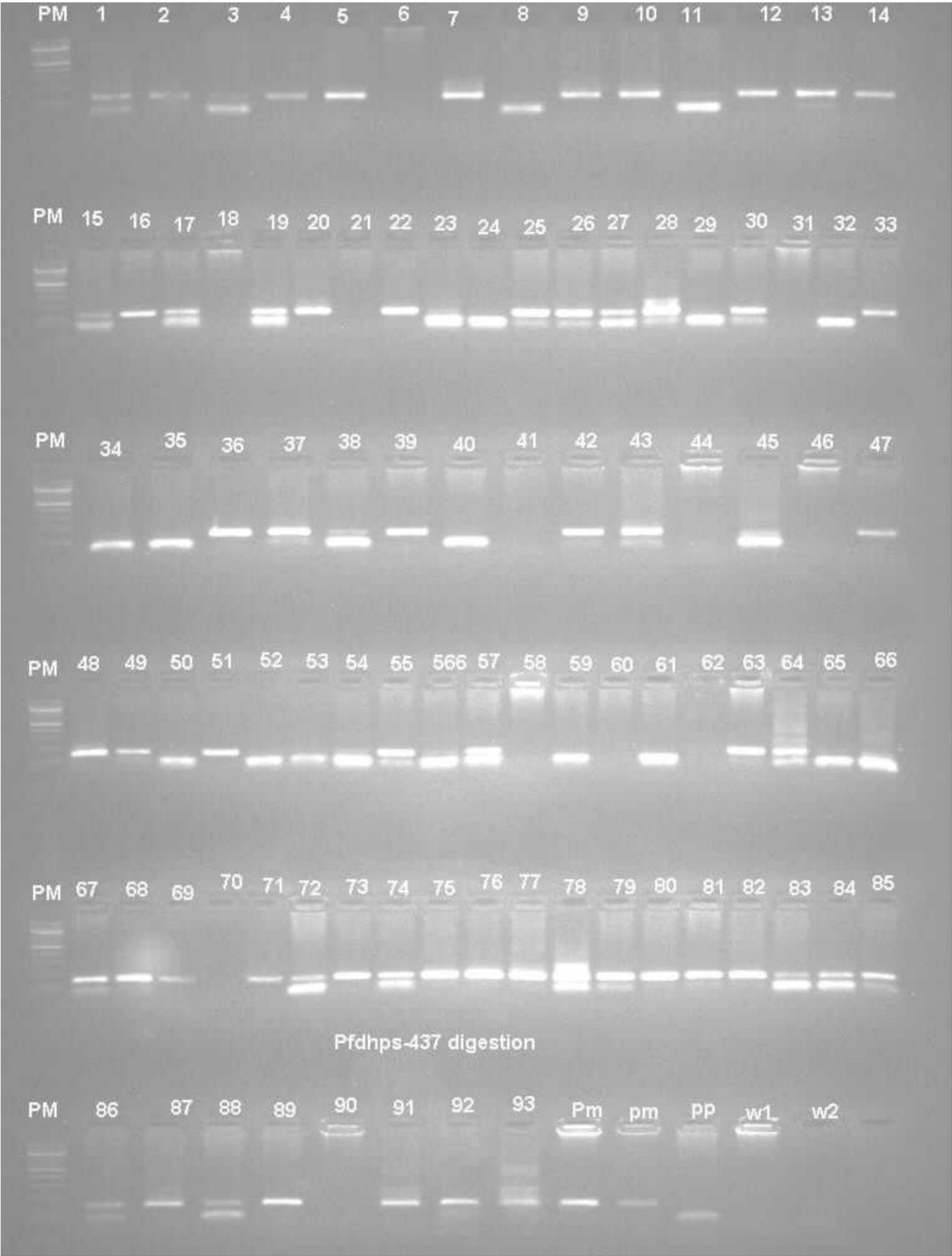


Figure 5: Digestion *Pfdhps* 437 ENIPT

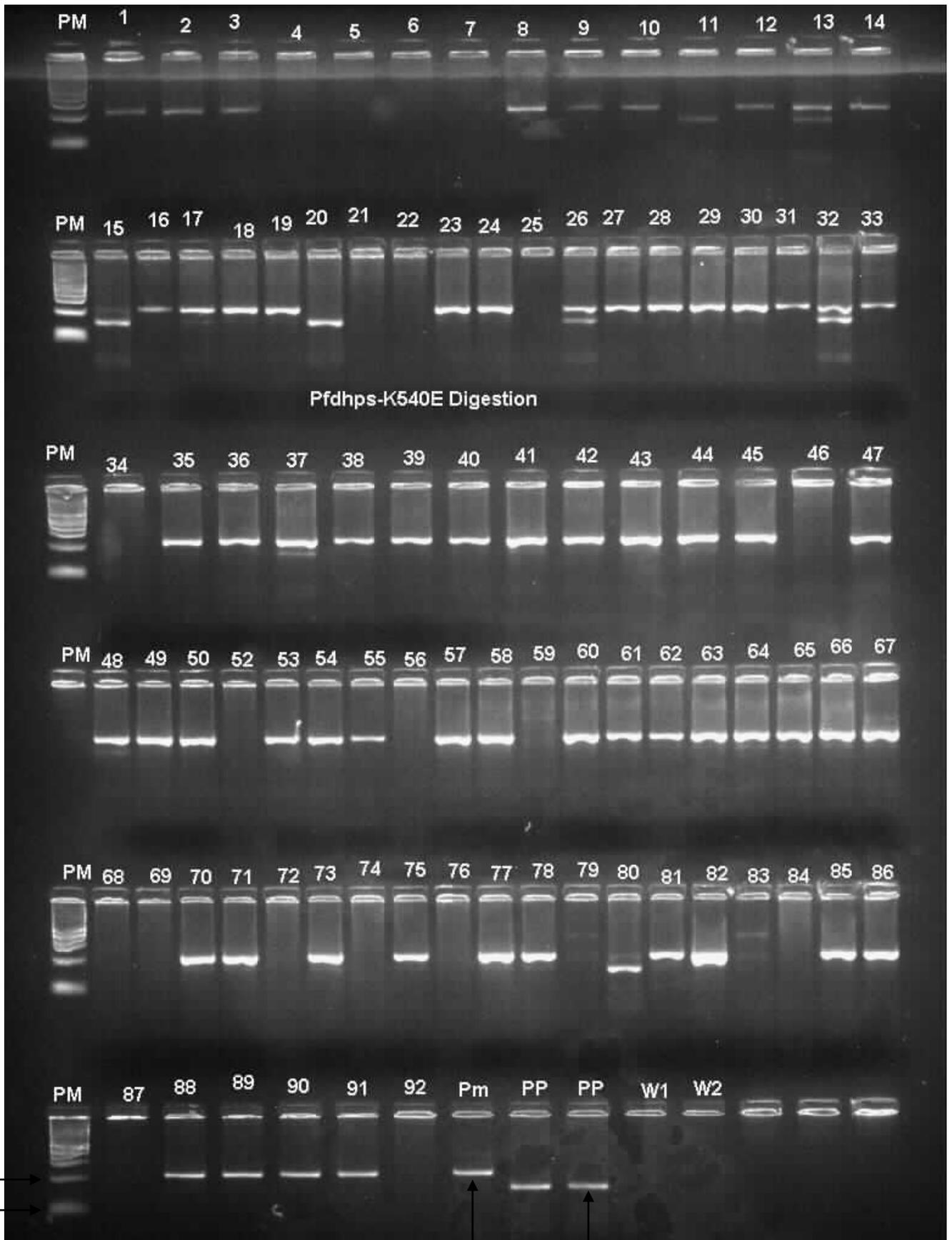


Figure 6: Digestion *Pfdhps* 540 ENIPT

▪ **Interprétation et validation des résultats :**

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

1) Conformité de la taille du produit de la digestion par rapport à celle attendue;

- ✓ L'enzyme de restriction utilisée AVA II coupe les souches de géotypes résistantes en 75 et 75 bp.
- ✓ L'enzyme de restriction utilisée FOK I coupe les souches de géotypes résistantes en 145 et 56 bp.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sensible correspondent aux souches sensibles.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspondent aux souches résistantes.
- ✓ Un échantillon est considéré comme mixte quand il présente à la fois une bande correspondant au sensible et une bande correspondant au résistant.

2) L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.

c) Détermination du géotype des codons 86 et 76 au niveau de *Pfmdr1et Pfcr1* respectivement [3]

▪ **Première amplification :**

- Identifier les tubes de 200 µl conformément aux numéros des confettis à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction;
- Repartir dans chaque tube identifié 20 µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 5 µl d'ADN extrait au Qiagen dans chaque tube correspondant;

Centrifuger brièvement les tubes;

Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié.

Couples d'amorces de la première amplification :

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1* :

Amorce sens MDR-1 : ATGGGGTAAAGAGAGAAAGA

Amorce anti-sens MDR-2 : AACGCAAGTAATACATAAAGTCA

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfcrt* :

Amorce sens P1 : CCGTTAATAATAAATACACGCAG

Amorce anti-sens P2 : CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC

Tableau XI: Mélange réactionnel de la première amplification pour un volume final de 25 μ l:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en μ l |
|----------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | - | - | 11,875 |
| Buffer / MgCl ₂ | 5X/ 17,5 mM | 3,5 mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 μ M | 2,5 |
| 100X Amorce 1 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| 100X Amorce 2 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U / μ l | 0,05 | 0.125 |
| Volume Total | | | 20 μ l |

On ajoute dans chaque tube **5 μ l de l'ADN extrait au Qiagen.**

Tableau XII: Programme de la première amplification de *Pfmdr1* et *Pfcrt*

| Etapas | Température | Temps |
|----------------------------------|--------------------|--------------|
| 1 Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 Dissociation | 92°C | 30 secs |
| 3 Association | 56°C | 30 secs |
| 4 Elongation | 60°C | 45 secs |
| 5 Retourner à l'étape 2, 44 fois | | |
| 6 Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 Fin du programme | 4°C | infini |

▪ **Deuxième amplification :**

- Identifier les tubes de 200 conformément aux numéros des produits de la première amplification à traiter;
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ml en fonction du nombre d'échantillons à traiter par réaction selon les tableaux ci-dessous;
- Repartir dans chaque tube identifié 24µl de mélange réactionnel;
- Ajouter 1 µl de l'ADN du produit de la première amplification dans le tube correspondant;
- Centrifuger brièvement les tubes;
- Placer les tubes bien fermés dans le Thermocycleur pour l'amplification avec le programme approprié;
- Faire l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2%;
- Faire la photo du gel.

Couple d'amorces de la deuxième amplification:

Amorces spécifiques au codon 86 de *Pfmdr1*:

Amorce sens : MDR-3 : TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA

Amorce anti-sens : MDR-4 : ATAAACCTAAAAAGGAACTGG

La taille attendue pour les produits de PCR est de 521 pb.

Amorces spécifiques au codon 76 de *Pfprt*:

Amorce sens : D1: TGTGCTCATGTGTTTAACTT

Amorce anti-sens : D2: CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG

La taille attendue pour les produits de PCR est de 134 pb.

Tableau XIII: Mélange réactionnel de la deuxième amplification pour un volume final de 25 μ l:

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par réaction en μ l |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | - | - | 15,875 |
| Buffer/ Mgcl ₂ | 5X/ 7.5 mM | 1X/ 1,5 mM | 5 |
| 10X dntp _s | 2 mM | 200 μ M | 2,5 |
| 100X Amorce D1 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| 100X Amorce D2 | 100 μ M | 1 μ M | 0,25 |
| Taq polymerase | 5U / μ l | 0,05 | 0.125 |
| Volume Total | | | 24 μ l |

On ajoute dans chaque tube **1 μ l du produit de la première amplification.**

Tableau XIV: Programme de la deuxième amplification de *Pfmdr1* et *Pfcrt*

| Etapes | Température | Temps |
|----------------------------------|--------------------|--------------|
| 1 Dissociation initiale | 95°C | 2 min |
| 2 Dissociation | 92°C | 30 secs |
| 3 Association | 48°C | 30 secs |
| 4 Elongation | 65°C | 45 secs |
| 5 Retourner à l'étape 2, 19 fois | | |
| 6 Elongation finale | 72°C | 15 min |
| 7 Fin du programme | 4°C | infini |

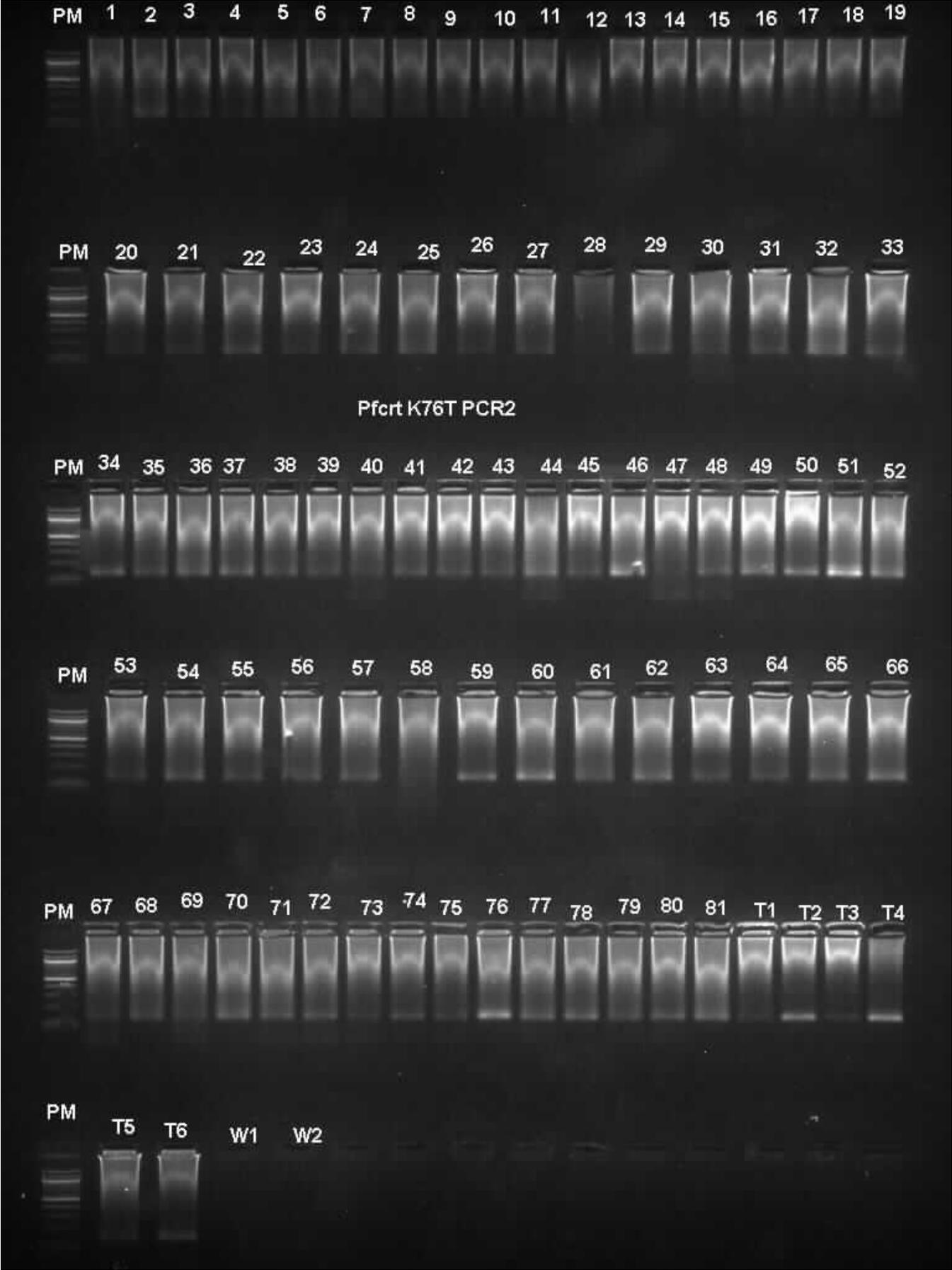


Figure 7: PCR2 *Pfert* ENIPT

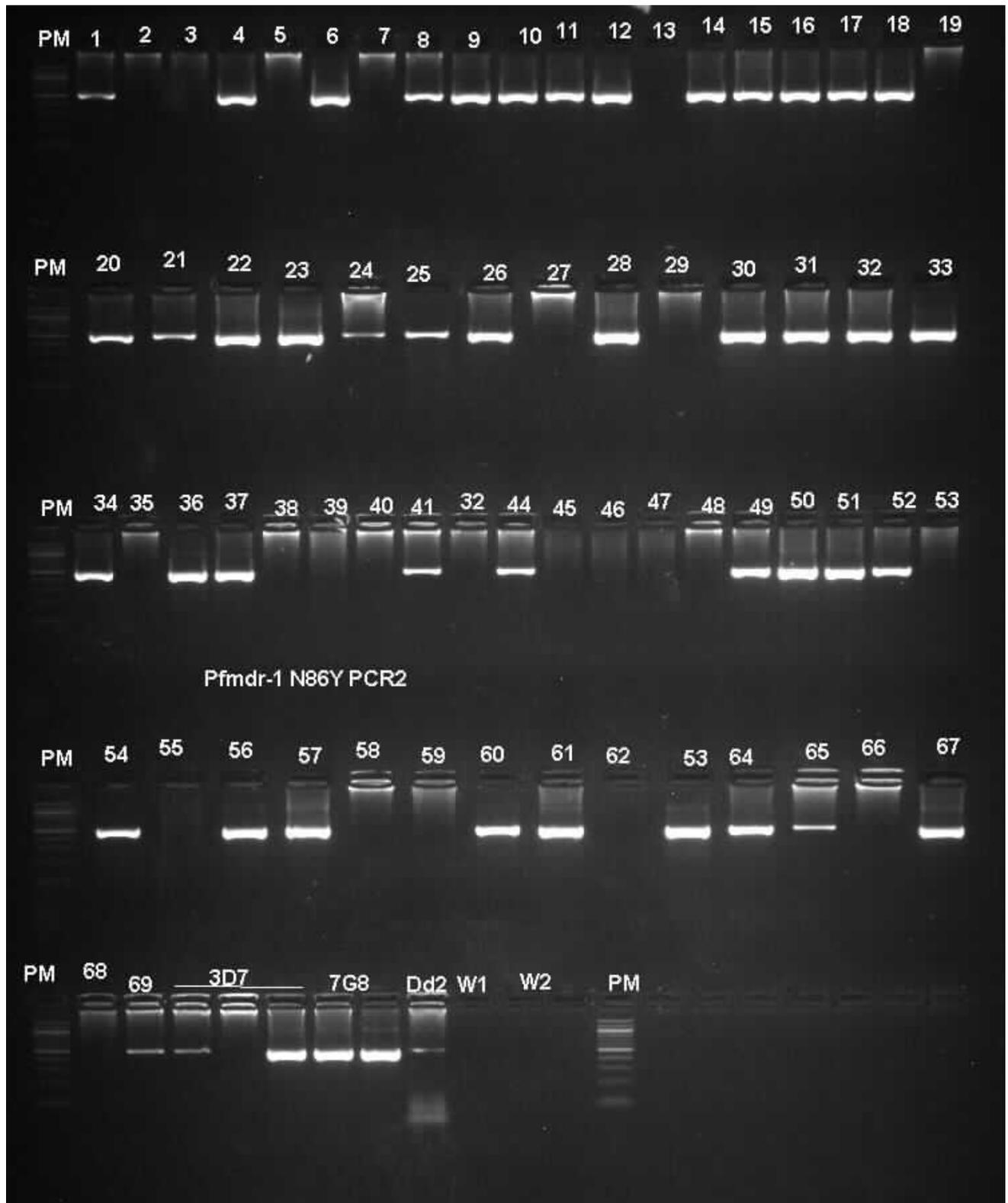


Figure 8: PCR2 *Pfmdr1* ENIPT

▪ Restriction enzymatique

Digestion enzymatique du produit de la 2^{ème} amplification :

- Inscrire sur les tubes les numéros des différents échantillons;
- Préparer le milieu réactionnel pour la digestion (tableau X) ;
- Distribuer dans chacun des tubes correspondants 15 µl de ce mélange réactionnel;
- Ajouter 5 µl du produit de la 2^{ème} amplification dans les tubes correspondant et les fermer;
- Mettre en incubation dans un thermocycleur ou un incubateur ou un bain-marie les tubes à 37°C pour l'enzyme AFL III et 50°C pour l'enzyme APO I respectivement pour *Pfmdr1* et *Pfcrt* pendant 30 minutes au minimum ou durant toute la nuit;
- Enlever les tubes du thermocycleur après le temps requis et les placer à + 4°C dans un réfrigérateur ;
- Procéder à la migration sur gel d'agarose à 2%;
- Faire la photo du gel.

Tableau XV: Composition du Mélange réactionnel de la digestion

| Réactifs | Volume par réaction | |
|------------------|---------------------|-------------------|
| | <i>Pfmdr1</i> N86Y | <i>Pfcrt</i> K76T |
| H ₂ O | 12,6 | 12,6 |
| 10X NEBUFFER 3.1 | 2 | 2 |
| AVA II | 0,4 | - |
| FOK I | - | 0,4 |
| Total | 15 | 15 |

On ajoute dans chaque tube **5 μ l du produit de la deuxième amplification.**

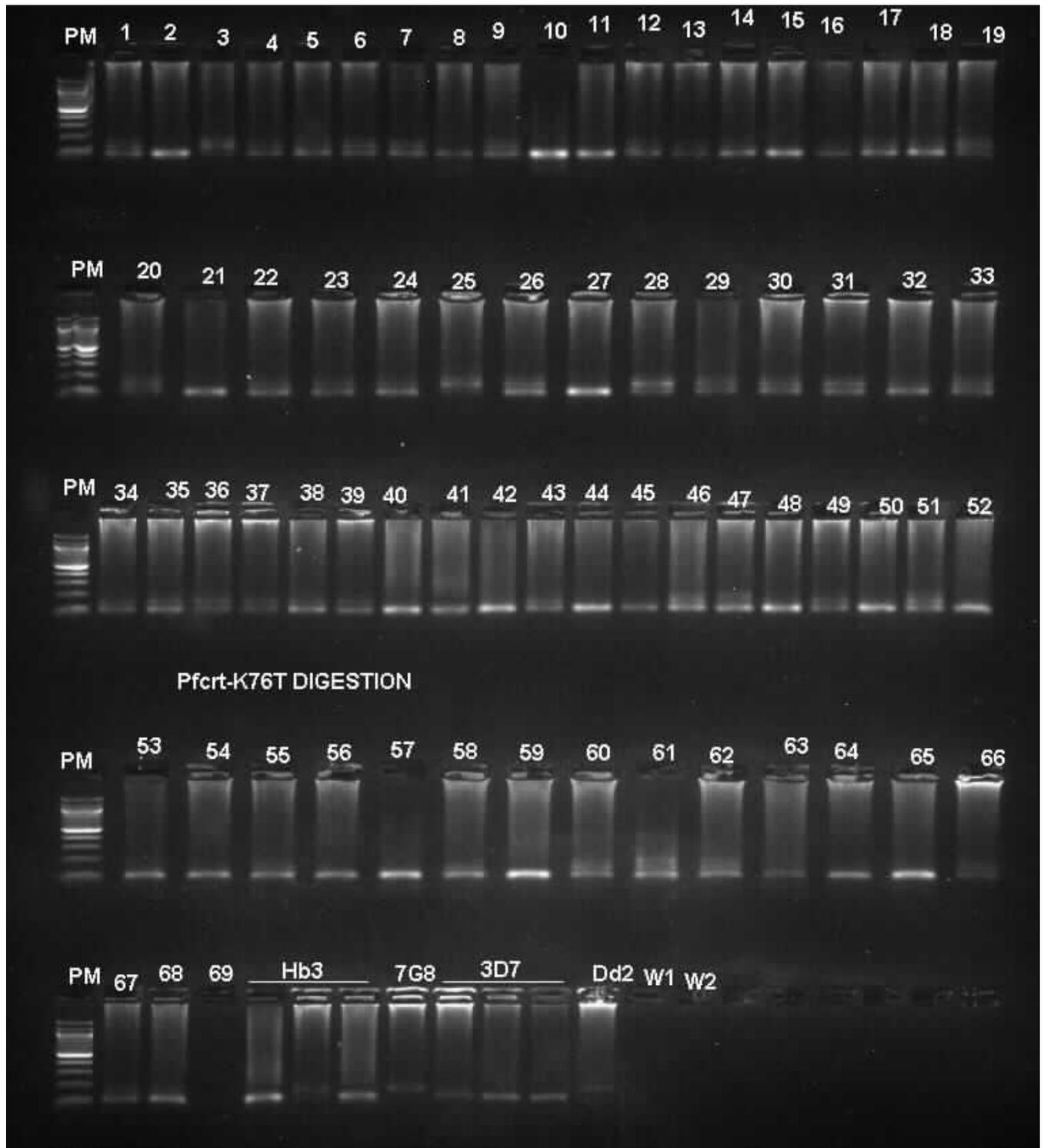


Figure 9: Digestion *Pfcrt* ENIPT

- **Interprétation et validation des résultats :**

L'interprétation de la photographie du gel tient compte des conditions suivantes :

1) Conformité de la taille du produit de la digestion par rapport à celle attendue;

- ✓ L'enzyme de restriction utilisée AFL III coupe les souches de géotypes résistantes en 295 et 226 bp.
- ✓ L'enzyme de restriction utilisée APO I coupe les souches de géotypes sensibles en 100 et 34 bp.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin sensible correspondent aux souches sensibles.
- ✓ Les échantillons avec des bandes de même taille que le témoin résistant correspondent aux souches résistantes.
- ✓ Un échantillon est considéré comme mixte quand il présente à la fois une bande correspondant au sensible et une bande correspondant au résistant.

2) L'absence de bandes au niveau des contrôles négatifs.

5. Analyse des marqueurs de résistance aux dérivés de l'artémisinine PF3D7_1343700 kelch protein K13

Le gène PF3D7_1343700 kelch protein K13 a été amplifié par nested PCR.

a) Matériels

Les matériels suivants ont été utilisés pour la PCR afin d'amplifier **1309** paires de base pour la première réaction et 1062 pour la deuxième réaction :

- i. BioTaq DNA Polymerase, Bioline Cat.# BIO-21040
- ii. MgCl₂ 50mM (supplied free with BioTaq)
- iii. 10x PCR Buffer (supplied free with BioTaq)
- iv. dNTP Set (100mM, 4 x 250µL) Bioline Cat.# BIO-39025. Combined and diluted to 8mM with distilled water.
- v. Nuclease free distilled water
- vi. Primers: Kelch 1st R FWD et Kelch 1st R REV pour la première PCR
- vii. Primers: Kelch Nested FWD et Kelch Nested REV pour la deuxième PCR
- viii. ADN extrait au QIAGEN en suivant les procédures du fabricant.

b) Analyse Bioinformatique.

Les données du séquençage ont été analysées par EMBOSS-6.6.0 et mafft-7.407-gcc sous Bio-Linux et visualisées avec BioEdit sous windows 2010

- i. Les fichiers binaires du séquençage à extension ab1 ont été transformés en fichier fasta par EMBOSS.
- ii. Les séquences forward et reverse ont été concaténés puis alignés par mafft.
- iii. Un consensus est fait entre les deux séquences en utilisant EMBOSS.
- iv. Les mauvaises lectures de nucléotides se trouvant aux extrémités des séquences dans les fichiers de consensus ont été supprimées en utilisant un script en perl.

- v. Les séquences qui n'ont pas une bonne couverture (inférieur à 200 nucléotides) ont été enlevées de l'analyse en utilisant un autre script en perl.
- vi. Toutes les séquences ont été alignées avec la séquence référence (3D7 2181 paire de base) en utilisant mafft.
- vii. Nous avons ensuite visualisé le fichier avec BioEdit pour voir les points et positions de mutation.

6. Diagnostic moléculaire des espèces de *Plasmodium* au Tchad [4,5]

a) Matériels

Les matériels et équipement suivants ont été utilisés pour l'identification moléculaire des espèces du *Plasmodium* infectant l'Homme. Nous avons utilisé la PCR quantitative (qPCR) pour la détection simultanée des espèces deux à deux comme suit : (*Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* dans une réaction ; *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*)

i. Quantitect Multiplex RT- PCR kit (200)

ii. Les amorces et sondes (probes)

▪ **18S Pf**

- Fluorophore : Cy5
- Amorce sens : CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAA
- Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
- Séquence de la sonde :
AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGAC

▪ **18S Pv**

- Fluorophore : FAM
- Amorce sens : CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTT
- Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
- Séquence de la sonde :
AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA

▪ **18S Pm**

- Fluorophore : FAM
- Amorce sens : CCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAA
- Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
- Séquence de la sonde : CTATCTAAAAGAAACACTCAT

▪ **18S Po**

- Fluorophore : Cy5
- Amorce sens : CCGACTAGGTTTTGGATGAAAGATTTTT
- Amorce anti- sens : AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
- Séquence de la sonde : CGAAAGGAATTTTCTTATT

- **Actin**

- Fluorophore : HEX
- Amorce sens : ACCGAGCGCGCTACAG
- Amorce anti- sens : CTTAATGTCACGCACGATTTCC
- Séquence de la sonde : TTCACCACCACGGCCGAGC

- iii. ADN – Uracil Glycosylase, labile à la chaleur
- iv. Les plaques de 96 puits (BioRad: HSP9601)
- v. Embouts steriles Barrier
- vi. Eau ultra pure pour la biologie moléculaire
- vii. Sceller adhésive de plaque, 100/PK (BioRad : MSB1001)
- viii. Micropipettes calibrées (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)
- ix. Centrifugeuse (Eppendorf ; cat#5804R)
- x. Pipettes multicanaux calibrées (2-20 µl et 20-200 µl)
- xi. Thermocycler BioRad C1000 Touch™ équipé du système en temps réel CFX96 BioRad et d'un ordinateur portable HP

7. Gestion et analyse des données

Les données ont été saisies sur Access et analysées sur STATA 13.0. L'analyse a consisté à calculer les fréquences absolues et les pourcentages sur les marqueurs de résistance. Le numérateur étant le nombre d'échantillons (personnes) portant des parasites mutants ou mixtes (porteur de marqueurs de résistance). Le dénominateur est le nombre total des échantillons analysés avec des résultats disponibles (mutants, mixtes ou sensibles) pour tous les 5 marqueurs de résistance pour la Sulfadoxine-pyriméthamine (DHFR N51I, C 59R et S108N et DHPS -A437G -K 540E) et les 2 marqueurs pour l'Amodiaquine (Pfcr76T et Pfmdr1-N86Y). Nous avons calculé les fréquences absolues et les pourcentages des mutations ponctuelles individuelles : DHFR 51, DHFR 59, DHFR 108, DHPS 437, DHPS 540, Pfcr76 et Pfmdr1. Dans un second temps, nous avons calculé les fréquences absolues et les pourcentages des mutations groupées : (i) triple mutation à la Dihydrofolate réductase (DHFR 51, 59 & 108) ; (ii) quadruple mutation à la Dihydrofolate réductase (DHFR 51, 59 & 108) et à la Dihydropteroate synthase (DHPS 437) ; (iii) quintuple mutation à la Dihydrofolate réductase (DHFR 51, 59 & 108) et à la Dihydropteroate synthase (DHPS 437 & 540) ; (iv) mutation de *Plasmodium falciparum* Pfcr76 et Pfmdr1 ; et (v) mutation croisée Pfcr76T Pfmdr186Y.

8. Résultats.

8.1. Résultats globaux

a) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à la SP

Tableau XVII : Fréquence des mutations à la *Dihydrofolate réductase* 51, 59 & 108 (*DHFR Triple*)

| Mutation <i>Pfdhfr C59R</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 1968 | 97,1 |
| Sensible (Sauvage) | 58 | 2,9 |
| Total | 2026 | 100 |

Tableau XVIII : Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase* 437 (*DHPS437*)

| Mutation <i>PfdhpsA437G</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 751 | 36,6 |
| Sensible (Sauvage) | 1302 | 63,4 |
| Total | 2053 | 100 |

Tableau XIX : Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase* 540 (*DHPS540*)

| Mutation <i>PfdhpsK540E</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 208 | 10,3 |
| Sensible (Sauvage) | 1806 | 89,7 |
| Total | 2014 | 100 |

Tableau XX : Fréquence des mutations quadruples (*DHFR Triple + DHPS437*)

| Mutations quadruples (<i>DHFR Triple + DHPS437</i>) | Nombre | Pourcentage |
|--|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 699 | 35,3 |
| Sensible (Sauvage) | 1279 | 64,7 |
| Total | 1978 | 100 |

Tableau XXI : Fréquence des mutations quintuples (*DHFR Triple + DHPS437 + DHPS540*)

| Mutations quintuples (<i>DHFR Triple + DHPS437 + DHPS540</i>) | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 74 | 3,9 |
| Sensible (Sauvage) | 1824 | 96,1 |
| Total | 1898 | 100 |

b) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à l'AQ

Tableau XXII : Fréquence de mutation de *Plasmodium falciparum* chloroquine Résistance transporter (*Pfcr76*)

| Mutation <i>Pfcr76T</i> | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 744 | 37,9 |
| Sensible (sauvage) | 1217 | 62,1 |
| Total | 1961 | 100 |

Tableau XXIII : Fréquence des mutations de *Plasmodium falciparum* multi-drug Resistance (*Pfmdr1*)

| Mutation <i>Pfmdr1</i> N86Y | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 398 | 20,6 |
| Sensible (Sauvage) | 1539 | 79,4 |
| Total | 1937 | 100 |

Tableau XXIV : Fréquence des mutations croisées de *Plasmodium falciparum* *Pfcr76* & *Pfmdr1*

| Mutation croisée | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 120 | 6,6 |
| Sensible (Sauvage) | 1699 | 93,4 |
| Total | 1819 | 100 |

c) Marqueurs moléculaires de la résistance aux dérivés de l'artémisinine

Deux cent un (201/201) échantillons ont donné une bande. 100% des échantillons ont pu être séquencés.

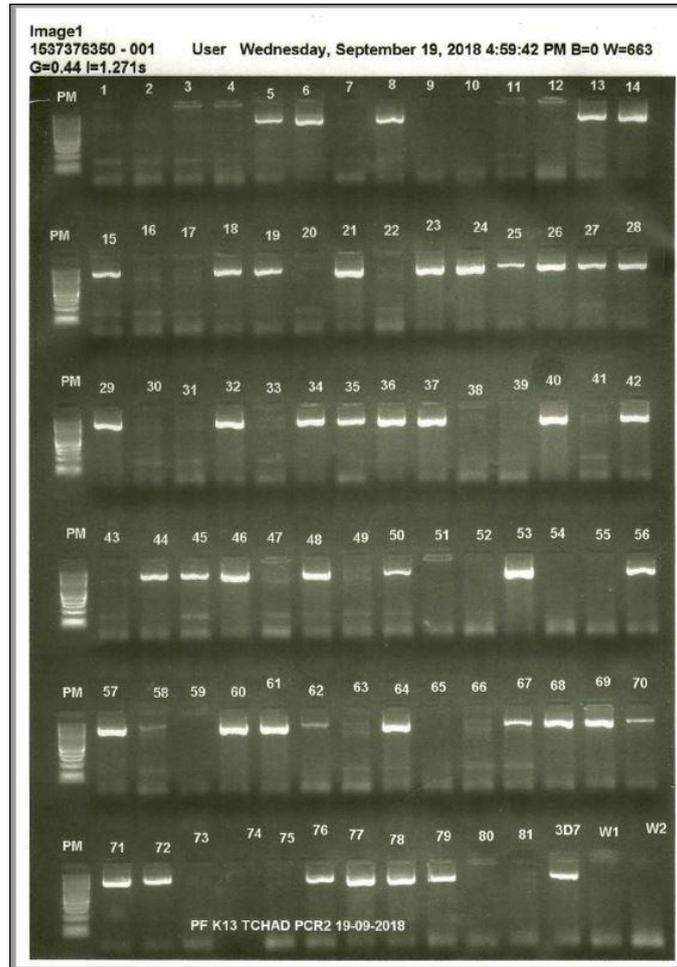


Figure1 : Photo du Gel de migration du produit de la deuxième PCR

Tableau XXV : Distribution du polymorphisme du gène K13 propeller

| Codon position | Nucleotid reference | Nucleotid mutation | Amino acid reference | Amino acid mutation | Number |
|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|--------|
| 567 | gaG | gaA | E (Glu) | E (Glu) | 2 |
| 589 | gtC | gtG | V (Val) | V (Val) | 2 |
| 605 | gaA | gaC | E (Glu) | D (Asp) | 1 |
| 616 | gcC | gcG | A (Ala) | A (Ala) | 1 |

Fréquence de Mutation synonyme : 0.025

Fréquence de mutation non synonyme : 0.005

d) Diagnostic moléculaire des espèces de Plasmodies

▪ **La prévalence moléculaire des espèces *Plasmodiales***

Tableau XXVI: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum*

| <i>Plasmodium falciparum</i> | Nombre | Pourcentage |
|------------------------------|--------|-------------|
| Positif | 1687 | 85,1 |
| Négatif | 296 | 14,9 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXVII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium malariae*

| <i>Plasmodium malariae</i> | Nombre | Pourcentage |
|----------------------------|--------|-------------|
| Positif | 415 | 20,9 |
| Négatif | 1568 | 79,1 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXVIII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium ovale curtisi*

| <i>Plasmodium ovale curtisi</i> | Nombre | Pourcentage |
|---------------------------------|--------|-------------|
| Positif | 96 | 4,9 |
| Négatif | 1887 | 95,1 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXIX: La prévalence moléculaire de *Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------------|--------|-------------|
| Positif | 30 | 1,5 |
| Négatif | 1953 | 98,5 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXX: La prévalence moléculaire de *Plasmodium vivax*

| <i>Plasmodium vivax</i> | Nombre | Pourcentage |
|-------------------------|--------|-------------|
| Négatif | 1983 | 100 |
| Total | 1983 | 100 |

▪ **La prévalence moléculaire des infections mixtes**

Tableau XXXI: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium malariae*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium malariae</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 385 | 19,4 |
| Négatif | 1598 | 80,6 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium ovale curtisi*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium ovale curtisi</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 94 | 4,7 |
| Négatif | 1889 | 95,3 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXIII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 26 | 1,3 |
| Négatif | 1957 | 98,7 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXIV: La prévalence moléculaire de *Plasmodium malariae* + *Plasmodium ovale curtisi*

| <i>Plasmodium malariae</i> + <i>Plasmodium ovale curtisi</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 32 | 1,6 |
| Négatif | 1951 | 98,4 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXV: La prévalence moléculaire de *Plasmodium malariae* + *Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium malariae</i> + <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 13 | 0,7 |
| Négatif | 1970 | 99,3 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXVI: La prévalence moléculaire de *Plasmodium ovale curtisi* + *Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium ovale curtisi</i> + <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|--|--------|-------------|
| Positif | 11 | 0,6 |
| Négatif | 1972 | 99,4 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXVII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum*+ *Plasmodium malariae* +*Plasmodium ovale curtisi*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium malariae</i> + <i>Plasmodium ovale curtisi</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 32 | 1,6 |
| Négatif | 1951 | 98,4 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXVIII: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum*+ *Plasmodium malariae* +*Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium malariae</i> + <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 13 | 0,7 |
| Négatif | 1970 | 99,3 |
| Total | 1983 | 100 |

Tableau XXXIX: La prévalence moléculaire de *Plasmodium falciparum*+ *Plasmodium malariae* +*Plasmodium ovale curtisi* +*Plasmodium ovale wallikeri*

| <i>Plasmodium falciparum</i> + <i>Plasmodium malariae</i> + <i>Plasmodium ovale curtisi</i> + <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Positif | 8 | 0,4 |
| Négatif | 1975 | 99,6 |
| Total | 1983 | 100 |

8.2. Résultats chez les femmes en âge de procréer

e) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à la SP

Tableau XXXX: Fréquence des mutations à la *Dihydrofolate réductase* 51, 59 & 108 (*DHFR Triple*)

| Mutation <i>Pfdhfr C59R</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 386 | 97,0 |
| Sensible (Sauvage) | 12 | 3,0 |
| Total | 398 | 100 |

Tableau XXXXI: Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase* 437 (*DHPS437*)

| Mutation <i>PfdhpsA437G</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 137 | 35,2 |
| Sensible (Sauvage) | 252 | 64,8 |
| Total | 389 | 100 |

Tableau XXXXII: Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase* 540 (*DHPS540*)

| Mutation <i>PfdhpsK540E</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 36 | 9,7 |
| Sensible (Sauvage) | 336 | 90,3 |
| Total | 372 | 100 |

Tableau XXXXIII : Fréquence des mutations quadruples (*DHFR Triple* + *DHPS437*)

| Mutations quadruples (<i>DHFR Triple</i> + <i>DHPS437</i>) | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 131 | 33,7 |
| Sensible (Sauvage) | 258 | 66,3 |
| Total | 389 | 100 |

Tableau XXXXIV: Fréquence des mutations quintuples (*DHFR Triple* + *DHPS437* + *DHPS 540*)

| Mutations quintuples (<i>DHFR Triple</i> + <i>DHPS437</i> + <i>DHPS540</i>) | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 13 | 3,6 |
| Sensible (Sauvage) | 352 | 96,4 |
| Total | 365 | 100 |

f) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à l'AQ

Tableau XXXXV: Fréquence de mutation de *Plasmodium falciparum* chloroquine Résistance transporter (*Pfcr76*)

| Mutation <i>Pfcr76T</i> | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 119 | 32,7 |
| Sensible (sauvage) | 245 | 67,3 |
| Total | 364 | 100 |

Tableau XXXXVI: Fréquence des mutations de *Plasmodium falciparum* multi-drug Resistance (*Pfmdr1*)

| Mutation <i>Pfmdr1N86Y</i> | Nombre | Pourcentage |
|----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 56 | 15,1 |
| Sensible (Sauvage) | 315 | 84,9 |
| Total | 371 | 100 |

Tableau XXXXVII: Fréquence des mutations croisées de *Plasmodium falciparum* Pfcr76 & Pfmdr1

| Mutation croisée | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 14 | 4,1 |
| Sensible (Sauvage) | 327 | 95,9 |
| Total | 341 | 100 |

8.3.

Résultats chez les enfants de moins de 5 ans

g) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à la SP

Tableau XXXXVIII : Fréquence des mutations à la *Dihydrofolate réductase* 51, 59 & 108 (*DHFR Triple*)

| Mutation <i>Pfdhfr</i> C59R | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 1061 | 97,5 |
| Sensible (Sauvage) | 27 | 2,5 |
| Total | 1088 | 100 |

Tableau XXXXIX: Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase* 437 (*DHPS437*)

| Mutation <i>PfdhpsA437G</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 513 | 42,6 |
| Sensible (Sauvage) | 692 | 57,4 |
| Total | 1205 | 100 |

Tableau XXXXX : Fréquence des mutations à la *Dihydropteroate synthase 540* (*DHPS540*)

| Mutation <i>PfdhpsK540E</i> | Nombre | Pourcentage |
|-----------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 183 | 15,4 |
| Sensible (Sauvage) | 1002 | 84,6 |
| Total | 1185 | 100 |

Tableau XXXXXI : Fréquence des mutations quadruples (*DHFR Triple* + *DHPS 437*)

| Mutations quadruples (<i>DHFR Triple</i> + <i>DHPS437</i>) | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 442 | 41,7 |
| Sensible (Sauvage) | 617 | 58,3 |
| Total | 1059 | 100 |

Tableau XXXXXII : Fréquence des mutations quintuples (*DHFR Triple* + *DHPS437* + *DHPS 540*)

| Mutations quintuples (<i>DHFR Triple</i> + <i>DHPS437</i> + <i>DHPS540</i>) | Nombre | Pourcentage |
|---|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 62 | 6,0 |
| Sensible (Sauvage) | 956 | 94,0 |
| Total | 1018 | 100 |

h) Fréquence des marqueurs moléculaire de la résistance à l'AQ

**Tableau XXXXXIII: Fréquence de mutation de *Plasmodium falciparum* chloroquine
Résistance transporter (*Pfcr76*)**

| Mutation <i>Pfcr76</i> | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 437 | 38,0 |
| Sensible (sauvage) | 712 | 62,0 |
| Total | 1149 | 100 |

**Tableau XXXXXIV: Fréquence des mutations de *Plasmodium falciparum* multi-drug
Resistance (*Pfmdr1*)**

| Mutation <i>Pfmdr1</i> | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 290 | 28,1 |
| Sensible (Sauvage) | 741 | 71,9 |
| Total | 1031 | 100 |

**Tableau XXXXXV: Fréquence des mutations croisées de *Plasmodium falciparum* *Pfcr76*
& *Pfmdr1***

| Mutation croisée | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| Mutant (Mutant et Mixte) | 90 | 9,3 |
| Sensible (Sauvage) | 878 | 90,7 |
| Total | 968 | 100 |

9. Discussion

La prévalence des mutations quintuple *dhfr+dhps* suggère une bonne efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine. Les prévalences obtenues étaient similaires entre la population générale et celle spécifique des femmes en âge de procréer. Cependant, le génotype des triples mutants *dhfr* a presque atteint un niveau de fixation (>97%). Cela rend nécessaire une surveillance régulière de l'efficacité de la SP dans le Pays.

La prévalence des mutations responsables de la résistance à l'amodiaquine sont assez faible tant dans la population générale que dans celle des enfants de moins de 5 ans, cibles de la CPS. La prévalence de la double mutation *pfprt 76T+pfmdr1 86Y* suggère une bonne efficacité de l'amodiaquine au Tchad.

La distribution spatiale des différents marqueurs ne montre pas de disparités notoires entre les différentes régions du Tchad (cf. Annexes).

Aucune mutation Pfk13 associée à la résistance aux dérivés de l'artémisinine n'a été détectée. *Plasmodium falciparum* est l'espèce prédominante suivie de *Plasmodium malariae*. Les espèces *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* sont présentes au Tchad. Nous n'avons pas trouvé d'infection à *Plasmodium vivax*. Cette formule parasitaire est similaire à celle trouvée en Afrique sub-Saharienne.

10. Conclusion

L'analyse des marqueurs moléculaires de la résistance aux médicaments antipaludiques indique que les médicaments utilisés pour prévention du paludisme chez la femme enceinte (SP) et ceux utilisés pour la chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) ont une bonne efficacité sur *Plasmodium falciparum* au Tchad.

La formule parasitaire est classique avec une prédominance de *P. falciparum* et une absence de *P. vivax*. Nous décrivons pour la première fois la présence des deux nouvelles espèces *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* au Tchad.

11. References

1. Plowe C V, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J. Infect. Dis.* 1997;176:1590–6.
2. Plowe C V., Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellem TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995;52:565–8.
3. Abdoulaye Djimde et al. A MOLECULAR MARKER FOR CHLOROQUINE-RESISTANT P. FALCIPARUM MALARIA. *New Engl. J.* 2001;344:257–63.
4. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-grochowska K, Yanow SK. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of Plasmodium Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections □. *2009;47:975–80.*
5. Phuong M, Lau R, Ralevski F, Boggild K. Sequence-Based Optimization of a Quantitative Real-Time PCR Assay for Detection of Plasmodium ovale and Plasmodium malariae. *2014;52:1068–73.*

12. Annexes

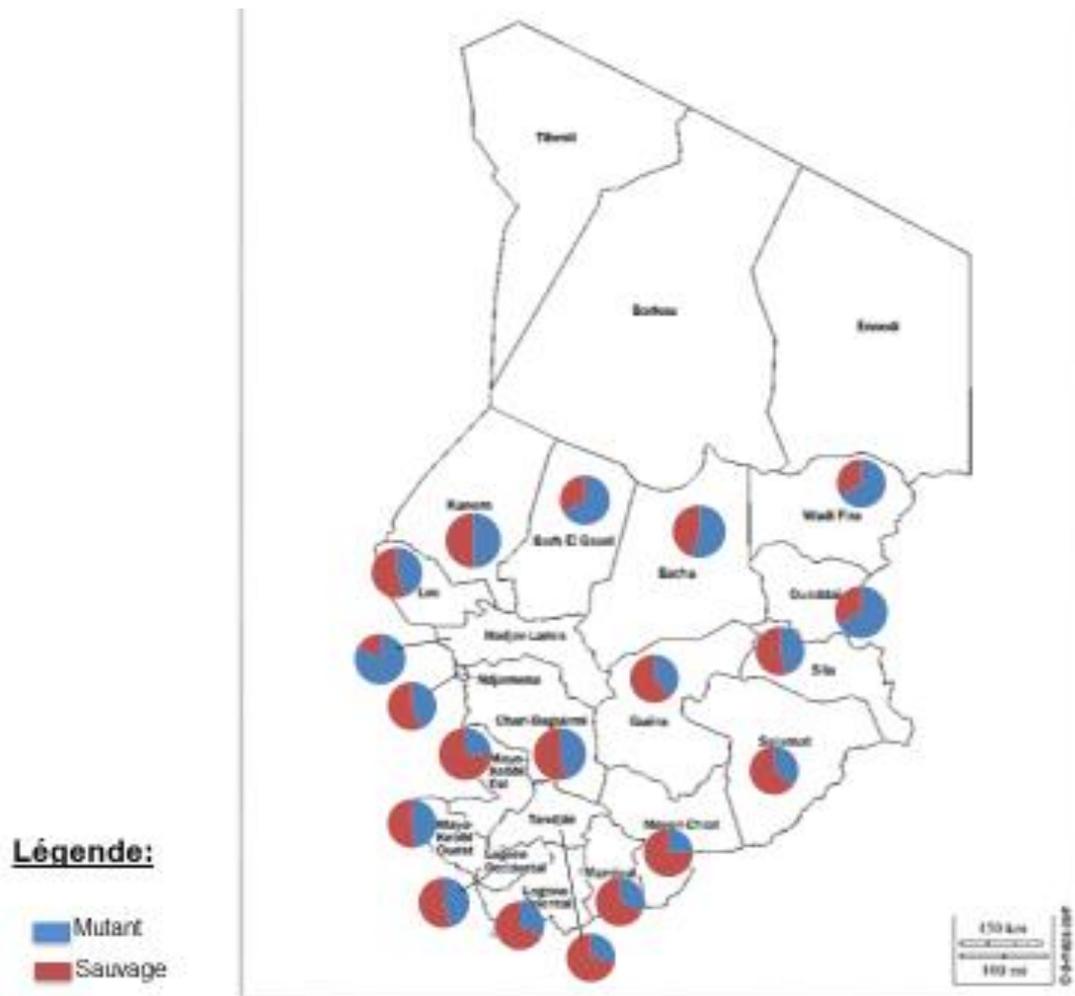


Figure 1: distribution des génotypes de *Pfprt* par région au Tchad

Légende:

- Sauvage
- Mutant

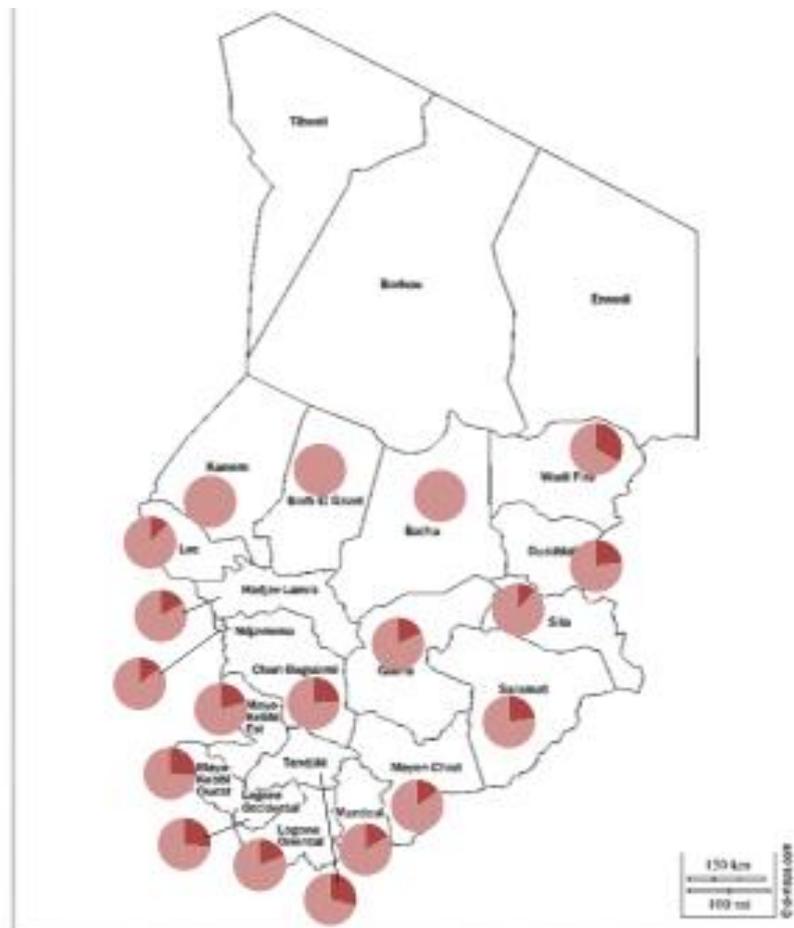


Figure 2: distribution des génotypes de *Pfmdr1* par région au Tchad

Légende:

- Mutant
- Sauvage

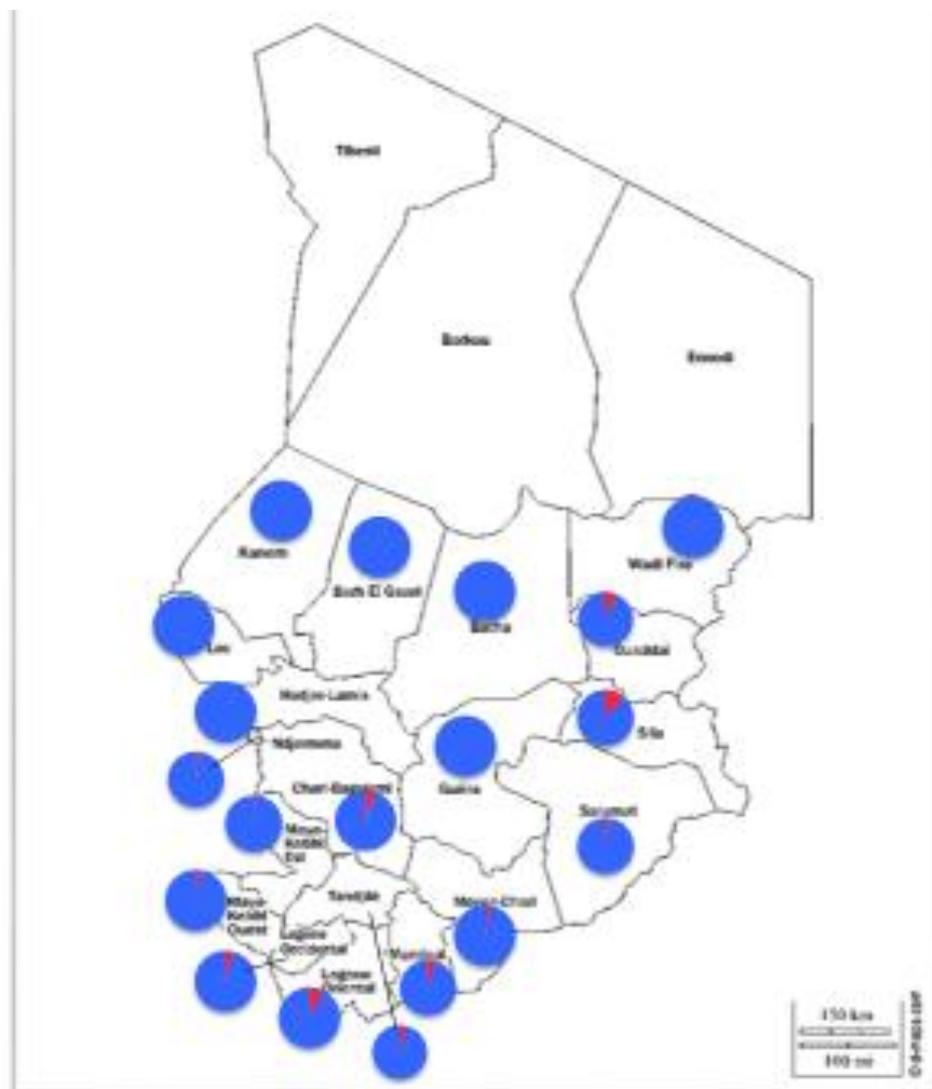


Figure 3: distribution des genotypes quintuple mutant *Pfdhps_dhfr* par région au Tchad