Le Tableau 3 nous montre les marqueurs moléculaires de résistance (voir annexe)

I-5-5- Les méthodes d'étude de résistance

Nous pouvons citer quatre principales méthodes :

- **Les tests d'efficacité thérapeutiques**

Méthode de références standardisées par l'OMS, ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués. L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au traitement :

L'échec thérapeutique précoce (ETP), l'échec parasitologique tardif (EPT), l'échec clinique tardif (ECT) et la réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) qui caractérise un parasite sensible. Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in vitro* et moléculaires.

- **Les tests *ex vivo et in vitro***

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex vivo*), soit après adaptation en culture continue (test in vitro), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissance d'un antipaludique. La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice 50% (**IC_{50}**), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50% des parasites (par rapports au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de s'affranchir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludiques). (**Ménard *et al.*, 2013**)

- **Test moléculaire**

Elle permet la recherche des marqueurs moléculaires en se basant sur la détection des mutations associées à une résistance à des antipaludiques. Par exemple, nous avons la mutation K76T corrélée avec la résistance à la chloroquine et N86Y à l'Amodiaquine et la Luméfantrine. **(Ndiaye et *al.*,2010)**

Chapitre II : Matériels et Méthode

II-1- Cadre et Population d'étude

II-1-1- Cadre

L'étude a eu lieu dans la région de Thiès qui appartient au faciès sahélien caractérisé par une transmission saisonnière courte (< 4 mois), assurée principalement *par An. arabiensis* et *An. gambiae*. Le taux d'inoculation entomologique (**TIE**) y est faible : 1<TIE<5. **(Faye *et al.*, 1995**) c'est une région où le paludisme est hypoendémique.

La ville de Thiès(**Figure 6**) dispose sur le plan sanitaire d'un service spécialisé sur la lutte contre le paludisme : c'est le service de lutte antiparasitaire (SLAP).

Figure 6: Carte de la région de THIES. Source :(www.ou-senegal.com)

II-1-2- Période d'étude

Les échantillons sont collectés entre les mois de Septembre et Novembre 2018 à Thiès.

II-1-3- Population d'étude

Elle est constituée par des patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* (confirmé par goutte épaisse et frottis) âgés entre 2 à 75 ans et qui sont venus en consultation au SLAP durant notre période d'étude. Dans cette population, nous avons sélectionné les patients avec qui nous avons obtenu un consentement pour participer à l'étude et qui répondaient aux critères d'inclusion et de non inclusion (**voir annexe**).

Chez les patients consentant, 5ml de sang veineux étaient prélevés dans un tube avec anticoagulant (EDTA) pour l'étude *ex vivo* et un papier filtre était confectionné pour le génotypage (**figure 7**).

1 2

Figure 7: 1-Sang veineux dans des tubes EDTA et 2-un papier filtre avec des spots Source : (Photo prise par l'équipe de terrain)

II-2- Méthodes

Pour faire ce travail, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- ✓ Pour l'étude de la chimiosensibilité des parasites aux antipaludiques, nous avons utilisé le test SYBR Green *ex vivo*.
- ✓ Pour le polymorphisme génétique de *Pfcrt* et *Pfmdr1*, nous avons utilisé la HRM.

II-2-1- Test *ex vivo*

II-2-1-1- Principe

Le test consiste à mettre en culture un isolat de *Plasmodium falciparum* pendant 48 à 72h en présence de molécule antipaludique et de faire la quantification de l'ADN parasitaire en utilisant la molécule SYBR Green.

La molécule SYBR Green se fixe spécifiquement sur l'ADN du parasite et émet une fluorescence bleue (**max 535 nm**) lorsqu'il est éclairé avec une lumière ultraviolette (**max485 nm**). Cette propriété du SYBR Green a été mise à profit pour évaluer la sensibilité des molécules. Le SYBR Green ou le $C_{32}H_{37}N_{45}$ est une molécule fluorescente qui permet de détecter et de quantifier l'ADN grâce à un appareil appelé **PLATE READER** ou **FLUORESKAN** (**Figure 8**). Une technique semblable a été utilisée pour étudier la sensibilité d'isolats de *P. falciparum* à différentes molécules antipaludiques par (**Ndiaye *et al.*, 2010**) dans le cadre d'une étude *ex vivo* avec la molécule de DAPI.

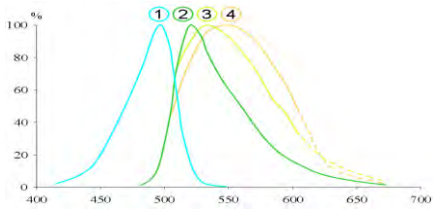


Figure 8: Longueurs d'onde d'excitation de : (1) SYBR Green I, (2) tous rapports de complexes SYBR green I/ADN double brin, (3 et 4) complexe SYBR green I/ADN simple

Source: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6a/SYBR_Green_wavelength.png/800px-SYBR_Green_wavelength.png

II-2-1-2 Mode opératoire

Le test *ex vivo* peut être subdivisé en quatre étapes :

- La préparation des plaques de culture, contenant les molécules à tester.
- La culture proprement dite.
- La quantification de l'ADN parasitaire
- La détermination ou le calcul de la Cl_{50} en utilisant le logiciel Graph pad Prism.

II-2-1-3- Préparation des solutions et des plaques de culture

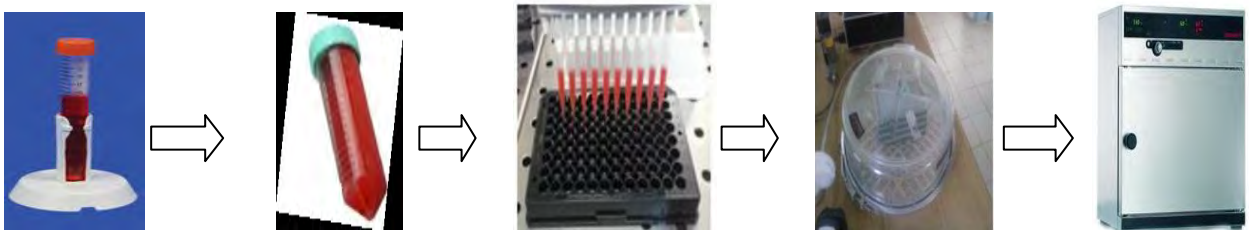
Cette préparation, se fait généralement avant la période de collecte et nécessite des plaques de 96 puits, du solvant **DMSO** (diméthylsulfoxyde), des molécules antipaludiques (disponibles en poudre), du milieu Roosvelt Park Memorial Institute **(RPMI)** et de l'eau distillée.

Elle consiste à préparer les solutions d'antipaludiques et à les distribuer dans des plaques de culture de 96 puits. Les antipaludiques étant sous forme de poudre, ils sont d'abord dissouts dans un solvant (DMSO, Eau ou Méthanol). Les solutions filles sont ensuite distribuées dans les plaques en respectant une série de dilution au demi. Sur la tableau 5 nous avons **plaque de culture avec les concentrations initiales diluées de quelques molécules (voir série de dilution en annexe)**

II-2-1-4- Culture

Les tubes de sang veineux sont reçus au laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital Aristide Le Dantec. Une fois au laboratoire le sang est transféré dans un tube Falcon de **15** ml puis centrifugé (2500g pendant 10 min) pour séparer le plasma et le culot globulaire. Le culot est lavé deux fois de suite avec du RPMI incomplet par centrifugation à 2500g pendant 5 min pour éliminer les composantes de l'immunité (anticorps et leucocytes). Pour que l'échantillon soit cultivé la parasitémie doit être comprise entre **0,4** et **1%** et l'hématocrite a été ajusté à **2%.** Pour cela, **24,5** mL de milieu RPMI complet est mélangé avec **0,5** mL de sang parasité. Le mélange ainsi obtenu est distribué dans les plaques de cultures (préchargées de 10 µL d'antipaludique) à raison de 90µL par puits. Les plaques sont placées dans une enceinte hermétique en présence d'un mélange de gaz (94% N_2, 5% de CO_2, 1% d'O_2) et incubées à **37 ° C** (**Figure 9**).

Après 48 h d'incubation, un premier contrôle de la croissance parasitaire est effectué sur les lames de contrôles. Les plaques sont congelées à 20°C jusqu'à la lecture.



Sang parasité — Solution de culture — Plaque de 96 puits — Enceinte hermétique — Etuve

Figure 9: Mise en culture d'isolats de Plasmodium falciparum dans une plaque de 96 puits. Source : (Photo prise au Laboratoire)

II-2-1-5- Lecture des plaques

Pour la lecture des plaques nous préparons une solution SYBR Green-Tampon. Pour cela, un mélange a été préparé à l'avance et conservé à la température ambiante. 0,2 µl de la solution SYBR Green (SYBR Green I acide nucléique gel Stain 10 000 ×, Sigma Aldrich) était mélangée avec 1 ml de la solution Tampon (solution de lyse). Le tampon de lyse contenait du Tris (20 mM, pH 7,5), de l'EDTA (5 mM), saponine (0,008% poids / volume) et Triton X-100 (0,08% volume / vol) (**Rason *et al., 2008)***. Un mélange 100 µl de la solution SYBR Green-Tampon a été distribué dans chaque puits. Après mélange, une incubation d'une heure est effectuée.

La quantification de l'ADN parasitaire est ensuite faite de façon indirecte en mesurant la fluorescence émise dans chaque puits à l'aide du **Fluoroskant Ascent** (**Tableau 6**).

Tableau 4: concentrations obtenues après lecture de la plaque 47.

Th047												
Plate 1												
	Measurement count: 1 Ex: 482 Em: 541 Scaling Factor : 1/1											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	**3,815**	**4,14**	**3,912**	**4,51**	**4,222**	**4,176**	**4,169**	**3,857**	**4,002**	**4,046**	**3,886**	**29,22**
	B	**4,272**	**9,558**	**10,39**	**7,89**	**8,261**	**9,913**	**6,859**	**10,59**	**20,37**	**19,45**	**27,01**	**32,42**
	C	**4,097**	**9,062**	**10,23**	**8,778**	**7,639**	**9,375**	**9,188**	**27,24**	**20,78**	**21,99**	**24,54**	**4,092**
	D	**4,253**	**9,192**	**9,851**	**7,709**	**9,241**	**14,63**	**27,89**	**19,92**	**31,81**	**23,25**	**25,8**	**4,628**
	E	**4,27**	**9,977**	**10,67**	**9,031**	**11,09**	**15,58**	**24,93**	**22,18**	**18,22**	**33**	**19,56**	**4,44**
	F	**3,794**	**8,639**	**9,862**	**10,6**	**8,752**	**11,06**	**23,09**	**26,99**	**29,64**	**29,22**	**22,43**	**4,18**
	G	**4,097**	**9,419**	**8,879**	**8,741**	**8,715**	**10,56**	**21,07**	**23,1**	**27,46**	**30,25**	**24,31**	**4,204**
	H	**3,632**	**3,729**	**3,911**	**3,916**	**3,966**	**3,944**	**3,954**	**4,125**	**3,925**	**3,501**	**3,864**	**3,956**
Plate 2													
	Measurement count: 1 Ex: 482 Em: 541 Scaling Factor : 1/1											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	**3,871**	**3,955**	**3,85**	**3,512**	**3,95**	**3,884**	**3,819**	**3,81**	**4,114**	**3,89**	**4**	**27,5**
	B	**3,603**	**8,544**	**8,976**	**9,229**	**10,77**	**18,75**	**24,19**	**26,58**	**30,43**	**27,41**	**28,02**	**30,07**
	C	**3,727**	**8,92**	**10,08**	**9,371**	**12,04**	**18,2**	**26,83**	**27,74**	**31,52**	**33,13**	**30,11**	**3,706**
	D	**3,789**	**8,96**	**8,912**	**8,924**	**9,051**	**10,16**	**15,53**	**23,08**	**22,04**	**26,23**	**29,62**	**3,576**
	E	**3,796**	**8,613**	**9,057**	**8,88**	**8,9**	**11,05**	**15,39**	**19,6**	**28,84**	**29,69**	**29,99**	**3,608**
	F	**3,711**	**10,22**	**9,234**	**9,625**	**10,84**	**12,85**	**21,81**	**22,25**	**29,44**	**29,26**	**29,85**	**3,826**
	G	**3,557**	**9,796**	**9,861**	**9,19**	**10,73**	**15,73**	**21,85**	**23,08**	**29,87**	**28,52**	**31,44**	**3,752**
	H	**2,697**	**3,953**	**3,932**	**4,162**	**4,114**	**3,904**	**4,3**	**4,149**	**4,022**	**3,858**	**3,877**	**3,739**

II-2-1-6- Détermination des CI_{50}

Les valeurs de CI_{50} ont été calculées à l'aide du logiciel graphique Pad Prism version 5. Le Clone de référence 3D7, sensible à tous les médicaments antipaludéens testés, a été utilisé pour chaque lot de plaques comme un contrôle technique.

II-2-2- Génotypage par la « High Resolution Melting » (HRM)

Deux marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques sont été étudiés : *Plasmodium falciparum* chloroquinoresistant transporter (*pfcrt*) et *Plasmodium falciparum* multidrug-resistant 1 (*pfmdr1*) (**Tableau 7**).

Tableau 5: séquence amorces-sondes des gènes *pfcrt* et *pfmdr1* (Daniels et al.,2012)

GENES	CODONS	AMORCES SENS	AMORCES ANTI-SENS	SONDES
Pfcrt	C72 / M74 /N75 / K76	GTAAAACGACGGCCAGTTTCTT GTCTTGGTAAATGTGCTCA	CAGGAAACAGCTATGACCGGATG TTACAAAACTATAGTTACCAA	GTGTATGTGTAATGAATAAAA TTTTTG-block
pfMDR	N86Y	TTATTATTTATATCATTTGTATGT GCTGTATTATCAGG	CAGGAAACAGCTATGACATCATT GATAATATAAATTGTACTAAACC TATAGATACT	GAACATGAATTTAGGTGATGA TATTAATCC-block
	Y184F	AGTTCAGGAATTGGTACGAAAT TTATAACA	ACGCAAGTAATACATAAAGTCAA ACG	CCTTTTTAGGTTTATATATTTG GTCAT-block
	N1042D	AAGAATTATTGTAAATGCAGCT TTATGGG	GGATTTCATAAAGTCATCAACTA ATATAGTACCTC	CAATTATTTATTAATAGTTTTG CCTAT block
	D1246Y	GCAGAAGATTATACTGTATTTA ATAATAATGGAGA	TTTCATATATGGACATATTAAATA ACATGGGT	GTGATTATAACTTAAGAGATC TTAGAAACT-block

II-2-2-1 Principe de la HRM

La « High resolution melting » (HRM) ou courbe de fusion (**Figure 10**) à haute résolution est une technique de la biologie moléculaire qui repose sur l'intégration dans l'ADN amplifié par PCR d'un fluorochrome intercalant. L'augmentation de la température programmée et progressive entraîne ainsi une dénaturation. Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit donc une baisse de la fluorescence ; son extinction est totale lorsque la dénaturation est complète. Chaque séquence d'ADN aura donc, une température standard, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Un changement de la séquence d'ADN induit une modification de la cinétique de fusion de l'ADN comparé à l'ADN normal qui pourra être détectée. La technique HRM ne permettant pas d'identifier précisément la nature des modifications de séquence d'ADN détectées, une confirmation des résultats mutés par une autre technique (séquençage) est nécessaire.

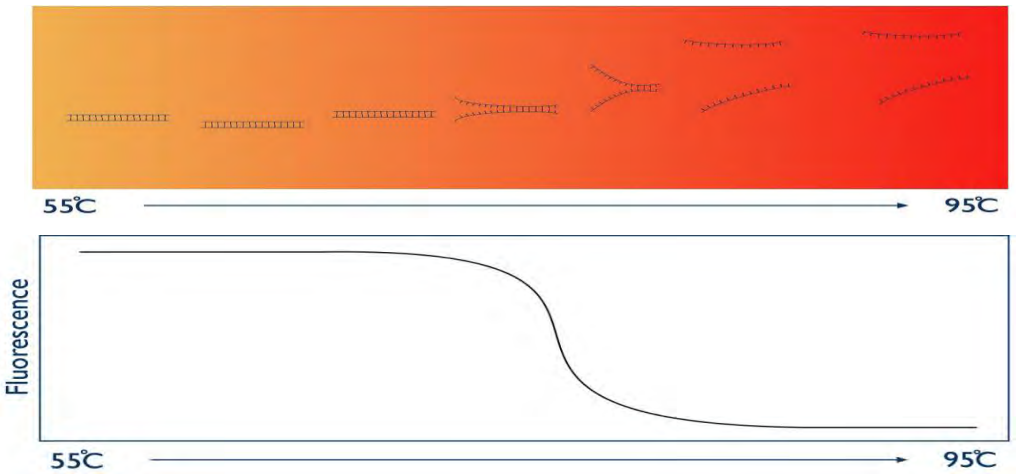


Figure 10: Principe de la fusion à haute température de l'ADN double brin (idaho technologie, 2012)