

Conclusion et Perspectives

La surveillance des antipaludiques est un outil puissant de lutte contre le paludisme. En testant directement les réponses aux médicaments antiparasitaires ou en étudiant les mutations génétiques associées à la résistance, nous pouvons être avertis rapidement de la baisse de sensibilité des parasites aux médicaments utilisés dans les associations thérapeutiques avant que les parasites ne deviennent très résistants et ne provoquent un échec thérapeutique.

Les CTA étant le traitement de première intention dans toute l'Afrique, la capacité à détecter la résistance aux dérivés de l'Artémisinine et aux composés partenaires au fur et à mesure que leur apparition deviendra de plus en plus important pour préserver l'efficacité de ces médicaments. (Van Tyne *et al.*, 2013).

C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude dans le but de contribuer à la surveillance de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux molécules antipaludiques (Chloroquine, Pipéraquine, Amodiaquine, Luméfantrine, Méfloquine et Quinine) utilisées au Sénégal. Le test *ex vivo* a été utilisé pour étudier la sensibilité des isolats de *Plasmodium* aux molécules antipaludiques. La HRM nous a permis de faire les génotypages des marqueurs moléculaires de résistance.

Afin de s'assurer de l'efficacité des antipaludiques, nous avons porté notre choix sur deux techniques qui s'accommodent particulièrement bien au contexte Africain. Il s'agit de l'*ex vivo* test et de HRM. Le SYBR Green-test nous a permis de faire des tests *ex vivo* et la HRM nous a permis d'évaluer l'efficacité d'une panoplie d'antipaludiques : la Chloroquine, la Pipéraquine, l'Amodiaquine, la Luméfantrine, la Méfloquine et la Quinine.

Nos résultats ont montrés une bonne efficacité de toutes les molécules antipaludiques utilisées et si cette tendance est observée pour ceux qui sont des dérivés d'Artémisinines, nous pouvons supposer que les CTA gardent leur bonne efficacité. Ceci est d'autant plus plausible que sur *in vivo* où de rares échecs thérapeutiques sont rapportés.

Toute fois l'augmentation la prévalence de l'haplotype NFD soulève quelque inquiétude aux vues de son implication supposée dans la résistance à l'Artémether-Luméfantrine.

En perspective, il serait souhaitable d'élargissement cette étude dans d'autres localités du pays où la transmission est élevée notamment dans le Sud et le Sud-Est et d'étudier toutes les molécules antipaludiques et leur combinaison.

Nous envisageons une étude plus approfondie pour la Pipéraquine qui est peu étudiée.

Il serait également très intéressant d'étudier l'Artémisinine et ses dérivés en faisant appel à des techniques telles que la RSA (Ring Survival Assay) et le séquençage.

REFERENCE :

1. Abiola, A., Ndiaye, M., Tine, R., Sylla, K., Lo, A. C., Gaye, A., ... Faye, B. (2016). **Assessment of Pfmdr1 and Pfcrt Mutations After Six Years of Implementation of Artemisinin-Based Combination Therapy in Dakar Senegal.** GLOBAL JOURNAL FOR RESEARCH ANALYSIS, 5(1), 223–227.
2. Agnamey. P., P. Brasseur., P. Eldin de Pecoulas., Michel Vaillant and P. Oliaro. (2006). **Plasmodium falciparum in vitro susceptibility to Antimalarial Drugs in Casamance (Southwestern Senegal) during the First 5 years of Routine Use of Artesunate-Amodiaquine.** ANTIMICROBAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, p.1531-1534, Vol. 50, n°4.
3. ANOFEL, **Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie** (2014). Paludisme.
4. Arieu, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., ... Ménard, D. (2014). **A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.** Nature, 505(7481), 50–55.
5. Ashley, E. a, Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., ... White, N. J. (2014). **Spread of Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria.** The New England Journal of Medicine, 371(5), 411–423.
6. Baliraine, F. N., & Rosenthal, P. J. (2011). **Prolonged selection of pfmdr1 polymorphisms after treatment of falciparum malaria with artemether-lumefantrine in Uganda.** The Journal of Infectious Diseases, 204(7), 1120–4.
7. CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2016). **Malaria.**
8. CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2017). **Malaria.**
9. Chien A, Edgar DB, Trela JM: **Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus.** J Bacteriol. 1976, 127:1550-1557
10. Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Sène, P. D., Sabeti, P. C., ... Wirth, D. F. (2012). **Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in Plasmodium falciparum.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(6), 2976–86.
11. Dièye B, (2016). **Chimiosensibilité des souches de P. falciparum isolées à Thiès de 2008 à 2012 : approche phénotypique et moléculaire.** Thèse de Doctorat d'Etat, Parasitologie, Dakar, Sénégal, n°199, 124p.
12. Diouf, (2013). **Chimiosensibilité ex vivo des souches de P. falciparum isolées à Thiès en 2011.** Thèse pharmacie, Dakar, Sénégal, n°96, 114p.
13. Djimde A, Doumbo OK et al., (2001). Cortese JF et al. **A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.** N Engl J Med. 2001; 344: 257-263 ;

14. Dondorp, AM., Rick, MF. (2009). **Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria**. White NJ, 2.
15. Fall, B., Pascual, A., Sarr, F. D., Wurtz, N., Richard, V., Baret, E., ... Pradines, B. (2013). ***Plasmodium falciparum* susceptibility to anti-malarial drugs in Dakar, Senegal, in 2010: an ex vivo and drug resistance molecular markers study**. *Malaria Journal*, 12, 107.
16. Faye, O., Gaye, O., Fontenille, D., Sy, N., Konate, L., Hebrard, G., Herve, J.P., Trouillet, J., Diallo, S., Mouchet, J., et al. (1995). **Comparison of the transmission of malaria in two epidemiological patterns in Senegal: the Sahel border and the Sudan-type savanna**. *Dakar Med.*, 1–7.
17. Fleischer, B. (2004). **Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia**. *Tropical Medicine and International Health*, 9(7), 755–756.
18. Francesca Chapadens, Ricardo Luiz Dantas MachadoAna Maria Revorêdo da Silva Ventura, André Áreas, Renato Beilner Machado,Giselle Rachid Viana, Mariano Gustavo Zalis, Ana Maria de Castroand Pedro Cravo. (2019). ***Plasmodium falciparum* malarial parasites from Brazil lack artemisinin resistance-associated mutations in the kelch13 gene**. C.
19. Idahotech. (2012). **LightScanner Data Report**.
20. Jiang, T., Chen, J., Fu, H., Wu, K., et al. (2019). **High prevalence of Pfdhfr-Pfdhps quadruple mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea**. *Malaria Journal*. [Online] 18 (1), 1–8.
21. Jovel, I. T., Kofoed, P.-E., Rombo, L., Rodrigues, A., & Ursing, J. (2015). **Temporal and seasonal changes of genetic polymorphisms associated with altered drug susceptibility to chloroquine, lumefantrine, and quinine in Guinea-Bissau between 2003 and 2012**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 872–9.
22. Kavishe, R. A., Paulo, P., Kaaya, R. D., Kalinga, A., van Zwetselaar, M., Chilongola, J., ... Alifrangis, M. (2014). **Surveillance of artemether-lumefantrine associated *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein-1 gene polymorphisms in Tanzania**. *Malaria Journal*, 13, 264.
23. Kublin, J., Cortese, J., Njunju, E., Mukadam, R., Wirima, J., Kazembe, P., ... Plowe, C. (2003). **Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi**. *J Infect Dis*, 187, 1870–5.
24. Lecamus JL, Raphenon G. ***Diagnosis of malaria in the field byfluorescence microscopy using QBC capillary tubes***. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86 : 460.(QBS)

25. Louise Trudel, M.S C. (2005). **Identification morphologique des parasites de la malaria**. Laboratoire de santé publique du Québec, Institut de santé publique du Québec, cahier de stage, 30p.
26. Maïmouna K, (2017). **Chimiosensibilité ex vivo de souches de Plasmodium falciparum au service de lutte Anti-Parasitaire (SLAP) de Thiés en 2015**. Mémoire de master en biologie animale spécialité parasitologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. No 327, 49p.
27. Mbaye, A., Dieye, B., Ndiaye, Y. D., Bei, A. K., Muna, A., Deme, A. B., ... Ndiaye, D. (2016). **Selection of N86F184D1246 haplotype of Pfmrd1 gene by artemether-lumefantrine drug pressure on Plasmodium falciparum populations in Senegal**. Malar J, 15(433), 10.
28. Mbaye, A., Gaye, A., Dieye, B., Ndiaye, Y. D., Bei, A. K., Affara, M., ... Ndiaye, D. (2017). **Ex vivo susceptibility and genotyping of Plasmodium falciparum isolates from Pikine, Senegal**. Malaria Journal, 16(250), 1–7.
29. Ménard, D., Arieu, F. & Mercereau-Puijalon, O. (2013). **Plasmodium falciparum susceptibility to antimalarial drugs: Global data issued from the Pasteur Institutes international network | étude de la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur**. Medecine/Sciences, 29(6–7).
30. Munier A., Diallo A., Sokhna C. et chippaux J P. (2009). **Evaluation d'un test de diagnostic rapide du paludisme dans les postes de santé ruraux du Sénégal**. Med trop, 69 ; 496-500
31. Naomi W., Maria Gaye., Mamadou Alpha Diallo., Awa Binta Deme... Ndiaye, D. (2016). **Evaluation of the illumigene Malaria LAMP : A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites**. Scientific Reports,8(3-6).
32. Nawaz, F., Nsobya, S. L., Kiggundu, M., Joloba, M., & Rosenthal, P. J. (2009). **Selection of parasites with diminished drug susceptibility by amodiaquine-containing antimalarial regimens in Uganda**. The Journal of Infectious Diseases, 200(11), 1650–7.
33. Ndiaye, D., Patel, V., Demas, A., LeRoux, M., Ndir, O., Mboup, S., ... Wirth, D. F. (2010). **Short report: A non-radioactive DAPI-based high-throughput in vitro assay to assess Plasmodium falciparum responsiveness to antimalarials - Increased sensitivity of P. falciparum to chloroquine in senegal**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 82(2), 228–230.
34. Ndiaye, D., Dieye, B., Ndiaye, Y.D., Daniels, R., VanTyne, D., Bei, A.K., Mbaye, A., Valim, C., Lukens, A., Mboup, S., Ndir, O., Wirth, D.F., Volkman, S. (2013). **Polymorphism in dhfr/dhps genes and ex vivo response to pyrimethamine in**

Plasmodium falciparum before and after implementing intermittent preventive treatment for pregnancy malaria in Thies (Senegal). Parasitology Research

35. Ndiaye, Y. D, Cyrille K Diédhiou, Amy Bei, Baba Dièye, Aminata Mbaye..... (2017). **High resolution melting: a useful field-deployable method to measure dhfr and dhps drug resistance in both highly and lowly endemic Plasmodium populations.** Malaria Journal. BioMed Central., 16(1), pp. 1–10.
36. PNLP. (2016a). **Bulletin épidémiologique annuel 2015 du paludisme au Senegal.**
37. PNLP. (2016b). **LE PALUDISME PLAN STRATEGIQUE NATIONAL DE LUTTE.**
38. PNLP. (2017). **Enquête Nationale sur les indicateurs du Paludisme au Sénégal.**
39. PNLP. (2018). **Guide national de diagnostic biologique du paludisme.**
40. Pradines, B., Rogier, C., Fusai, T., Tall, A., J F Trape, J., & C Doury. (1998). **In vitro activity of artemether against African isolates (Senegal) of Plasmodium falciparum in comparison with standard antimalarial drugs.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 58(3), 354–357.
41. Pradines, B., Tall, A., Fusai, T., Spiegel, A., Hienne, R., Rogier, C., ... Parzy, D. (1999). **In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of Plasmodium falciparum in comparison with those of standard antimalarial drugs.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(2), 418–20.
42. Pradines B., Tall A., Rogier, C., Spiegel A., Mosnier J., Marrama L., Fusai T., Miller P., Panconi E., Trape J.F., Parry D., 2002. **In vitro activities of ferrochloroquine against senegalese isolates of Plasmodium falciparum in comparison with those of standard antimalarial drugs.** Trop med health, 7: 265-70.
43. Pradines B et al. (2013). **Plasmodium falciparum susceptibility to anti-malarial drugs in Dakar, Senegal, in 2010: an ex vivo and drug resistance molecular markers study.** Malaria Journal, 12, 107.
44. Price, RN, Cassar, C, Brockman, A et al. (1999) **The pfmdr1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in Plasmodium falciparum from the western border of Thailand.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 2943– 2949.
45. Quashi N.B, Duah N.O, Abuaku B, Quaye L, Ayanful-TogGby R. (2013). **A SYBER Green 1-based in vitro test of susceptibility of Ghanaian Plasmodium falciparum clinical isolates to a panel of anti-malarial drugs.** Malaria J, 12; 450.
46. Sarr, O. A. M., Daily, Johanna. Diop, Bernard M. Ndir, Omar. Sow, Pape Salif. Souleymane Mboup, A., & Wirth, D. F. (2008). **In vivo and in vitro analysis of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum isolates from Senegal.** 97(2), 136–140.

47. Sisowath, C., Ferreira, P. E., Bustamante, L. Y., Dahlstro, S., Martensson, A., Bjorkman, A., ... Jose Gill, P. (2007). **The role of pfmdr1 in Plasmodium falciparum tolerance to artemether-lumefantrine in Africa.** *Tropical Medicine and International Health*, 12(6), 736–742.
48. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. (May 2010). **Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally".** *The Journal of Infectious Diseases*. 201 (10): 1544–50. doi:10.1086/652240. PMID 20380562.];
49. Tangpukdee, N., Chatnapa, D., Polrat, W., & Srivicha, K. (2009). **Malaria Diagnosis: A Brief Review.** *Korean J Parasitol.*, 93–102.
50. Van Tyne, D., Dieye, B., Valim, C., Daniels, R. F., Sène, P. D., Lukens, A. K., ... Ndiaye, D. (2013). **Changes in drug sensitivity and anti-malarial drug resistance mutations over time among Plasmodium falciparum parasites in Senegal.** *Malaria Journal*, 12, 441.
51. Warhurst, D., & Williams, J. . (1996). **Laboratory diagnosis of malaria.** *Clin. Pathol.*, 533–538.
52. WHO. (1974). **Serological testing in malaria.** *Bulletin of the World Health Organization*, 50(6), 527–35.
53. WHO. (1994). **Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme. Partie I : guide du stagiaire.** Hors-série,
54. WHO. (2000). **Severe falciparum malaria, third edition.**
55. WHO. (2008). **Comment utiliser les tests diagnostiques rapides (TDR) : un guide pour la formation au niveau du village et du district.** Geneve.
56. WHO. (2010b). **Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.**
57. WHO. (2012). **World malaria report.** Geneva, Switzerland.
58. WHO. (2013a). **Rapport mondial sur le paludisme.**
59. WHO. (2013b). **WHO | Q&A on artemisinin resistance.** WHO. (2016). **Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests:** Information note, (December). Available at: WHO. (2017). **Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance.** Genève Suisse.
60. WHO. (2018). **POIDS DU PALUDISME AU NIVEAU MONDIAL ET RÉGIONAL : QUELQUES CHIFFRES.**
61. Wong, R. P. M., Lautu, D., Tavul, L., Hackett, S. L., Siba, P., Karunajeewa, H. A., ... Davis, T. M. E. (2010). **In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to conventional**

and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. Tropical Medicine and International Health Volume, 15(3), 342–349.

WEBOGRAPHIE

<https://media1.picsearch.com/is?uR7NAIjib6FoqwscnJ7rNSpHEtdUc7BMgtyRIxC7D-4&height=27030>

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antipaludeens-les-points-essentiels>

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

Annexe

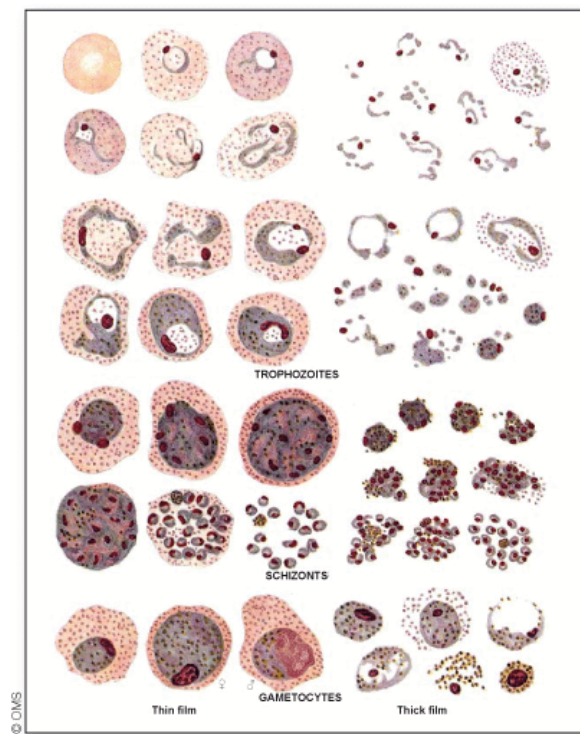
Tableau I : critère d'identification morphologique des parasites de la malaria

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
Taille	normale	normale	agrandie	Agrandie, mais pas autant que <i>P. vivax</i> .
Forme	Ronde, parfois crénelée	Ronde	Ronde, ovoïde, parfois déformée par le parasite.	Ronde, ovale. • Extrémités souvent effilochées (20-30 % des cellules infectées).
Couleur	Normale ou plus foncée	Normale	Normale ou plus pâle.	Normale
granulations	Taches de Maurer (grains violacés) habituellement peu nombreuses. Pas aussi nombreuses que les grains de Schüffner. • S'observent plus facilement dans les frottis bien colorés.	Grains de Ziemann (rares et délicats lorsque présents). • Le frottis doit être trop coloré (inhabituel).	Grains de Schüffner (pH important). • Petits grains rouges dont le nombre augmente au fur et à mesure du développement du parasite. • Nombreux.	• Grains de Schüffner (pH important). • Petits grains rouges dont le nombre augmente au fur et à mesure du développement du parasite.
% cellules infection	Toutes les cellules peuvent être infectées.	Cellules plus âgées infectées. • Rarement plus de 1 % de cellules infectées	Cellules jeunes infectées. • Rarement plus de 2 % de cellules infectées.	Cellules jeunes infectées. • Rarement plus de 2 % de cellules infectées.

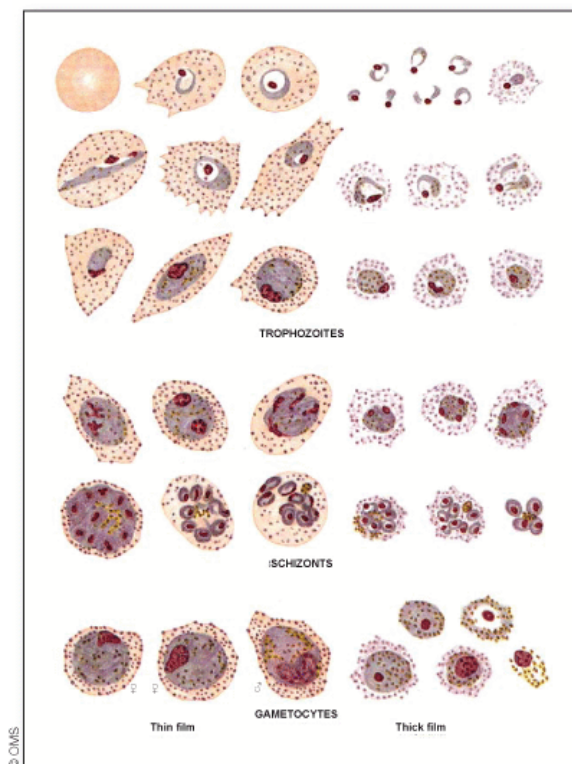
Source : (Louise Trudel *et al.*, 2005)



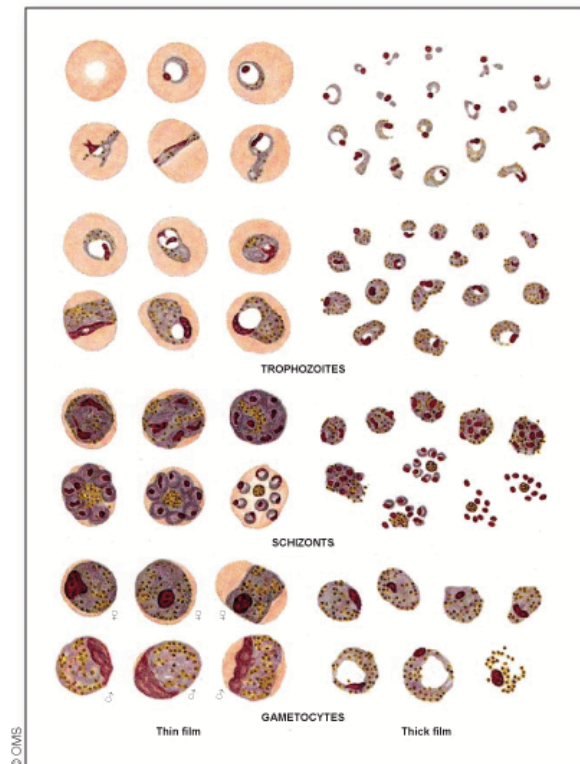
| *Plasmodium falciparum*.



| *Plasmodium vivax*.



| *Plasmodium ovale*.



| *Plasmodium malariae*.

Figure1 : les différentes espèces de Plasmodium du paludisme humain et leurs stades biologiques sur un frotti mince sanguin. Source : Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme. Partie I : guide du stagiaire. Hors-série, OMS, 1994

Tableau IV : marqueurs moléculaires de résistance

Molécule	Gene	Codon
Chloroquine	<i>Pfcrt</i>	Lys76Thr
Amodiaquine	<i>pfdmr1</i>	Asn86Tyr
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala
Méfloquine	<i>pfdmr1</i>	Nombre de copie > 1
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn
	<i>Pfdhfr</i>	Triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly
	<i>Pfdhps</i>	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu
	<i>pfdhfr + pfdhps</i>	Quintuple mutation : Ser108Asn (dhfr) + Asn51Ile (dhfr) + Cys59Arg (dhfr) + Ala437Gly (dhps) + Lys540Glu (dhps)
	<i>Pfmrp</i>	Lys1466Arg
Proguanil (cycloguanil)	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Va
	<i>Pfdhfr</i>	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg
Atovaquone	<i>Pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser
Luméfantrine	<i>pfdmr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1
Quinine	<i>pfnhe-1 (ms4760)</i>	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNND < 3
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala
Doxycycline	<i>pftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN <3
	<i>pftetQ</i>	Nombre de copie >1
	<i>Pfmdt</i>	Nombre de copie >1
Artemisinin	<i>Pfserca, pfk13</i>	Ser769Asn, C580Y

Source : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antipaludeens-les-points-essentiels>

Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- Infection à *P. falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse et un frottis mince ;
- Densité parasitaire comprise entre mille (1000) et (200000) formes asexuées/µl de sang ;

- Absence de signes généraux de danger ou d'autres signes de paludisme à *P. falciparum* grave et compliqué tels que définis par l'OMS (WHO, 2000) ;
- Fièvre ou histoire de fièvre dans les 48 h ;
- Absence d'antécédents de réactions d'hypersensibilité aux médicaments évalués ;
- Âge compris entre 2 et 75 ans
- Vivant dans un rayon de 10 km de la structure sanitaire
- Consentement éclairé et signé

Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion sont les suivants :

- Absence de consentement du malade, de ses parents ou de ses tuteurs ;
- Accès difficile à la structure sanitaire ;
- Critères d'exclusion propres à certains médicaments ;
- Grossesse et allaitement
- Âgé moins de deux (2ans)

Les patients ayant rempli les critères d'inclusion étaient invités à participer à l'étude par le biais d'un consentement écrit. Afin de conserver la confidentialité des inclus, un code connu seulement par les responsables de l'étude était utilisé en guise d'identification.

Préparation et supplémentation du milieu RPMI

Pour la préparation du milieu RPMI, nous avons besoin de l'eau distillée, du RPMI en poudre, de l'HEPES, de la Gentamicine, de l'Hypoxanthine, du chlorure d'hydrogène, un erlenmeyer, un agitateur magnétique et de la soude (NaOH 5N).

Pour une préparation d'un litre de solution, nous dissolvons dans 750 ml d'eau distillée 10,44 g de RPMI et 5,94 g d'HEPES. Ensuite, 0,05 g d'Hypoxanthine, complètement dissout dans 1ml de soude et diluée au 1/10 et 0,5 ml de gentamicine sont ajoutés dans la solution. Nous complétons les 25 ml d'eau distillée restante et ensuite le pH est réajusté à 6,75. Enfin la solution est stérilisée par filtration et est conservée à +40°C. Cette solution ne pourra être utilisée que pour le lavage de culot globulaire ou la dilution de solution d'antipaludique.

La supplémentation est réalisée par addition, dans 1 litre de milieu RPMI, de sérum humain inactivé à la chaleur (50 ml), de l'Albumax II à 5% (50 ml) et du bicarbonate de sodium à 3,6% (60 ml).

Tableau VI : plaque de culture avec les concentrations initiales diluées de quelques molécules

		Final Syber Green Drug (nM)											
Plate 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI
CQ	B	RPMI	750	375	187,5	93,75	46,875	23,438	11,719	5,8594	2,9297	0	RPMI
CQ	C	RPMI	750	375	187,5	93,75	46,875	23,438	11,719	5,8594	2,9297	0	RPMI
PQ	D	RPMI	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,9063	1,9531	0	RPMI
PQ	E	RPMI	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,9063	1,9531	0	RPMI
AMD	F	RPMI	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7813	0,3906	0	RPMI
AMD	G	RPMI	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7813	0,3906	0	RPMI
	H	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	Kill
		Final Syber Green Drug (nM)											
Plate 2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI
LUM	B	RPMI	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	0	RPMI
LUM	C	RPMI	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	0	RPMI
MFQ	D	RPMI	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,9063	1,9531	0	RPMI
MFQ	E	RPMI	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,9063	1,9531	0	RPMI
QN	F	RPMI	1500	750	375	187,5	93,75	46,875	23,438	11,719	5,8594	0	RPMI
QN	G	RPMI	1500	750	375	187,5	93,75	46,875	23,438	11,719	5,8594	0	RPMI
	H	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	Kill

EXTRACTION ADN :

L'extraction de l'ADN parasite est faite à partir du papier filtre collecté à l'aide du Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. La paillasse et l'ensemble des matériels à utiliser sont nettoyés à l'alcool 70° avant toutes manipulations. Découper dans chaque tube eppendorf de 2 ml unique pour chaque numéro environ 3 mm² du confetti. Il faudra toujours nettoyer le ciseau avant de couper un autre confetti. Dans chaque tube eppendorf, nous ajoutons 180µl de tampon ATL avant de faire une incubation de 10 minutes à 850C. Après cette phase, 20µl de protéinase K sont ajoutés dans le tube, bien mélanger par vortex, brièvement centrifuger et incubé à 560C pendant 1 heure.

Ensuite, nous ajoutons 200µl de la solution tampon AL. L'ensemble est incubé à 700C pendant 10mn. Cette étape est celle de la lyse membranaire et permet la libération de l'ADN. Après l'incubation, nous ajoutons 200 µl d'éthanol (96-100%) dans chaque tube, ensuite nous les mélangeons au vortex et enfin nous les centrifugeons brièvement. Cette étape permet de faire la précipitation de l'ADN par l'alcool. Le contenu des tubes est ensuite déposé à l'aide d'une pipette de 1000 µl dans un tube avec colonne QIAamp préalablement numéroté en évitant de toucher les bords. Les tubes sont centrifugés à 8.000 tours par minute (t/mn) pendant 1 minute. Cette étape permet la fixation de l'ADN au niveau de la colonne de silice. La colonne est placée dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, celui contenant le filtrat est jeté. Nous ajoutons 500 µl du tampon AW1 en évitant de toucher les bords, suivi d'une centrifugation à 8.000 t/mn pendant 1 minute. La colonne QIAamp est placée dans un

nouveau tube collecteur de 2 ml, le tube contenant le filtrat est jeté. Nous y ajoutons 500 µl de tampon AW2, ensuite nous centrifugeons les tubes à 14.000 t/mn pendant 3 minutes. Cette étape est celle du lavage. La dernière étape, celle de l'élution (avec deux éluions E1 et E2), consiste à placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et d'y ajouter 50 µl du tampon AE. Les tubes sont ensuite incubés à la température ambiante pendant 3 minutes avant d'être centrifuger à 8.000 t/mn pendant 1 minute. La première élution (E1) est plus concentrée en ADN que la deuxième. Le filtrat obtenu contenant de l'ADN est conservé au congélateur à -20°C pour une utilisation ultérieure.

TITRE : Evaluation ex vivo et moléculaire des molécules antipaludiques à Thiès en 2018

Nature du Mémoire : Mémoire de diplôme de Master II en Biologie Animale

Présenté et soutenu par Mme AWA FALL DIEYE le 03 Décembre 2019 au Département de Biologie Animale

Résumé :

Les antipaludiques ont un rôle important à jouer non seulement dans la prise en charge mais aussi dans la chimio prophylaxie du paludisme. Dans ce Mémoire, nous nous sommes intéressés à évaluer l'efficacité d'une panoplie d'antipaludiques : la Chloroquine, la Pipéraquline, l'Amodiaquine, la Luméfantrine, la Mefloquine et la Quinine. Pour ce faire, nous avons utilisé le SYBER Green-test (une méthode *ex vivo* d'évaluation de la chimio sensibilité des antipaludiques) et la High Resolution Melting (une méthode moléculaire) qui permet l'étude de SNPs au niveau de certains gènes de résistance telle que le *pfcr*t et le *pfmdr*1. Un niveau de sensibilité élevée des isolats à l'Amodiaquine, la Piperaquine, la Mefloquine et la Quinine a été enregistré. Une tendance à une augmentation de la sensibilité des isolats à la Chloroquine a été également observée. Par contre, une diminution de la sensibilité à la Luméfantrine (avec une forte sélection de l'haplotype N86F184D1246) a été observée. Pour la Pipéraquline, aucune association n'a été retrouvée entre son efficacité et les mutations ponctuelles sur les gènes *pfcr*t et *pfmdr*1 aux niveaux des codons 76, 86, 184 1042 et 1246. Ce qui pourrait s'expliquer par les techniques utilisées. Ainsi, nous recommandons que soit conduite, une surveillance *in vivo* des combinaisons à base de dérivées d'Artémisinine utilisées au Sénégal en particulier l'Artéméther-Luméfantrine.

Mots clés : Paludisme, antipaludiques, SYBER Green, HRM, Sénégal.

Abstract :

Antimalarial drugs play an important role in the management and the chemoprevention of malaria. In this study, we assessed the efficacy of Chloroquine, Piperaquine, Amodiaquine, Lumefantrine, Mefloquine and Quinine using the SYBER Green-test (an *ex vivo* method for evaluating the chemo sensitivity of antimalarials) and the High-Resolution Melting (a molecular method used to study the SNPs in *pfcr*t and *pfmdr*1). A high level of sensitivity of isolates to Amodiaquine, Piperaquine, Mefloquine and Quinine was recorded. An increased sensitivity of our isolates to Chloroquine has also been noted. In contrast, a decreased sensitivity of our isolates to Lumefantrine with a strong selection of haplotypes N86F184D1246 was observed. For Piperaquine, no association was found between its efficacy and point mutations in the *pfcr*t gene at codon level 76 and *pfmdr*1 gene at codon levels 86, 184, 1042 and 1246. This could be explained by the techniques used. Therefore, we recommend that an *in vivo* monitoring of combinations based on Artemisinin derivatives used in Senegal, in particular Artemether-Lumefantrine, be conducted.

Keywords : Malaria, antimalarial drugs, SYBER Green, HRM, SENEGAL