

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	5
I.1. Le paludisme	6
I.1.1. Définition du paludisme	6
I.1.2. Epidémiologie	6
I.1.2.1. Agents pathogènes	6
I.1.2.1.1. Classification	6
I.1.2.1.2. Cycle évolutif	6
I.1.2.2. Transmission	9
I.1.2.2.1. Vecteurs	9
I.1.2.2.2. Faciès épidémiologiques	9
I.1.2.2.3. Modes de contamination	10
I.1.2.2.4. Facteurs favorisant	10
I.1.3. Clinique	10
I.1.3.1. Chez les accès simples	10
I.1.3.2. Chez les accès pernicieux	11
I.1.4. Diagnostic biologique	13
I.1.4.1. Frottis sanguin	13
I.1.4.2. Goutte épaisse	13
I.1.4.3. Quantitative Buffy Coat (Q. B. C.)	13
I.1.4.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)	13
I.1.4.5. Tests rapides de diagnostic (TRD)	13
I.1.5. Traitement	13
I.1.5.1. Schizonticides	14
I.1.5.1.1. Schizonticides naturels	14
I.1.5.1.2. Schizonticides de synthèse	14
I.1.5.2. Gamétocytocides	16
I.1.6. Chimiorésistance	16
I.1.6.1. Définition	16
I.1.6.2. méthodes d'étude de la résistance	16

I.1.6.3. Gènes impliqués dans la résistance	17
I.1.6.3.1. Le gène dhfr	17
I.1.6.3.2. Le gène dhps	17
I.1.6.4. Mécanismes	17
I.1.6.5. Chimiorésistance multiple	19
I.1.6.6. Facteurs favorisants	19
I.1.7. Polymorphisme génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	19
I.1.7.1. Description	19
I.1.7.2. Analyse du polymorphisme	20
I.2. Technique de la réaction de polymérisation en chaîne	20
I.2.1. Historique	20
I.2.2. Principe	21
I.2.3. Composantes de la PCR	22
I.2.3.1. L'ADN	22
I.2.3.2. Les amorces	23
I.2.3.3. L'enzyme	23
I.2.3.4. Les nucléotides	23
I.2.3.5. Le tampon	24
I.2.3.5.1. Le Tris HCl	24
I.2.3.5.2. Le Chlorure de Magnésium	24
I.2.3.5.3. Le chlorure de potassium	24
I.2.3.5.4. Les détergents et la gélatine	24
I.2.3.6. L'eau	24
I.2.4. Conditions de la réaction	25
I.2.4.1. Dénaturation	25
I.2.4.2. Hybridation	25
I.2.4.3. Elongation	25
I.2.5. Détection et analyse des produits de PCR	26
I.2.5.1. Migration électrophorétique	26
I.2.5.2. Révélation des produits de PCR	26
I.2.6. Digestion enzymatique	26
I.2.7. Contamination en PCR	27

II. MATERIEL ET METHODES	28
II.1. Cadre d'étude	29
II.1.1. Historique du centre de santé	29
II.1.2. Situation géographique	29
II.1.3. Missions	29
II.2. Matériel et réactifs de laboratoire	29
II.2.1. Matériel	29
II.2.2. Réactifs	30
II.3. Méthodes d'étude	30
II.3.1. Extraction	31
II.3.2. PCR	31
II.3.3. Migration sur gel électrophorétique	32
II.3.4. Digestion enzymatique	33
II.3.5. Révélation	34
III. RESULTATS	35
III.1. Caractéristique de la population d'étude	36
III.2. Amplification du gène dhfr	36
III.3. Digestion enzymatique	36
IV. DISCUSSION	40
CONCLUSION et PERSPECTIVES	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48

INTRODUCTION

De toutes les affections parasitaires, le paludisme à *Plasmodium falciparum* est celle qui frappe le plus d'êtres humains et qui est responsable de la plus importante mortalité. Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par la piquûre d'un moustique, l'anophèle femelle. Il menace 40% de la population mondiale ; dans plus de 90 pays, 300 à 500 millions de cas sont diagnostiqués tous les ans et 1,5 à 1,7 millions d'individus en meurent.

Le genre *Plasmodium falciparum* est responsable de plus de 75% des cas de paludisme dans le monde et plus de 80% des décès se produisent en Afrique subsaharienne. Les enfants et les femmes enceintes sont les plus vulnérables (OMS, 2005)¹.

La lutte antipaludique a été menée depuis des millénaires avec des moyens variés. Pour éradiquer ce fléau dans le monde, l'OMS a mené un programme au début des années 1960. Malheureusement les résultats n'ont pas été à la hauteur des attentes. Cependant, les stratégies à la fois anti-vectorielles (assèchement des marais, usages massifs d'insecticides tels que le DDT) et la chimioprophylaxie, avaient permis la réduction substantielle de la morbidité palustre dans beaucoup de régions endémiques.

Malgré ces multiples politiques de lutte, la maladie persiste surtout dans les pays les plus pauvres. La lutte contre le paludisme y est rendue difficile à cause des conditions socio-économiques défavorables qui ne permettent pas toujours aux populations d'accéder à un traitement approprié. Plusieurs contraintes ont rendu plus aléatoire l'espoir d'endiguer ce fléau à l'échelle mondiale parmi lesquelles nous pouvons citer, le coût très considérable des programmes antipaludiques et l'insuffisance du budget de la santé publique dans la plupart des pays en développement. A ceci s'ajoute une extension de la chimiorésistance dans toutes les régions endémiques. Notamment, l'émergence et la rapide progression de la résistance du *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, l'apparition de la résistance à l'association sulfadoxine-pyriméthamine, la diminution de la sensibilité à la quinine en Asie du Sud-Est et la résistance de l'anophèle à certains insecticides de synthèse (DDT).

Ainsi, une redéfinition des stratégies thérapeutiques et de contrôle de la maladie s'impose. Toutes les données anciennes et récentes montrent que le paludisme est d'une haute endémicité dans la majeure partie de la région afro tropicale et que sa prévalence est telle qu'il peut y être considéré comme une composante de l'écologie humaine. Le Sénégal ne fait pas exception : sa situation géographique et ses conditions climatiques font que le paludisme y constitue une endémie majeure dans la presque totalité du pays (Bâ-Fall, 2000). Et c'est

¹OMS : World Malaria Report, 294p.

pour cette raison que le Sénégal s'est doté d'un Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en 1995. Ce programme a inscrit la surveillance de l'efficacité des antipaludiques et la prise en charge correcte des cas reposant sur l'administration de molécules antipaludiques efficaces et accessibles comme activités prioritaires.

Les antipaludiques constituent la principale défense contre *Plasmodium falciparum* et la chloroquine était un des médicaments les plus utiles jamais développés. Cependant la chimiorésistance de l'agent du paludisme grave s'est étendue en Afrique et dans le monde. Les souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* étaient fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques qui contribuent à augmenter la mortalité paludéenne chez les sujets sans immunité. Ainsi à partir de l'année 2000 en Afrique, la sulfadoxine-pyriméthamine était devenue avec l'amodiaquine, les seules molécules disponibles pour un traitement à coût acceptable de l'accès palustre simple. Les dérivés de l'artémisinine qui sont très efficaces sont d'un coût relativement élevé.

Depuis 2001, l'OMS a recommandé le changement de politique de traitement des formes simples avec l'utilisation de combinaison d'antipaludique notamment celle qui sont à base de dérivés de l'artémisinine (ACT). C'est ainsi que le Sénégal a abandonné en 2003 la Chloroquine et a choisi d'association Amodiaquine plus Sulfadoxine-pyriméthamine comme stratégie transitoire avant l'adoption d'un ACT.

De même, le Sénégal a abandonné la chimioprophylaxie chez la femme enceinte par la chloroquine et a adopté une stratégie préventive dénommée : Traitement Préventif Intermittent (TPI) qui utilise la Sulfadoxine –pyriméthamine (SP).

Le TPI consiste à administrer une dose thérapeutique d'un antipaludique au cours des visites prénatales systématiques, au deuxième et au troisième trimestre de la grossesse.

Devant l'utilisation important de la Sulfadoxine – pyriméthamine, il devient important de surveiller régulièrement son efficacité. Pour cela, la biologie moléculaire notamment la PCR constitue un outil de choix pour rechercher des mutations génétiques au niveau de l'ADN du plasmodium responsable de la perte de sensibilité à une molécule donnée.

C'est dans ce cadre que nous avons mené ce travail dont le but est d'étudier la prévalence de mutations du gène dhfr de *P. falciparum*, la cible des antifoliques tels que le pyriméthamine et le cycloguanil. Cette étude s'est déroulée durant l'année 2003 sur des patients venus en consultation dans le district sanitaire de Pikine.

La première partie de ce travail porte sur des généralités sur le paludisme et sur la technique de réaction de polymérisation en chaîne.

La deuxième décrit l'étude expérimentale qui a été menée puis expose les différents résultats obtenus, à partir desquels, des conclusions et perspectives sont tirées.

GENERALITES

I.1. Le paludisme

I.1.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une affection parasitaire fébrile due au développement et à la multiplication, d'abord dans les hépatocytes puis dans les hématies, de quatre espèces de sporozoaires appartenant toutes au genre *Plasmodium* transmis par l'anophèle femelle. Seule la phase endo-érythrocytaire a une traduction clinique ou domine la fièvre.

I.1.2. Epidémiologie

I.1.2.1. Agents pathogènes

I.1.2.1.1. Classification

Phylum des *Apicomplexa*

Classe des *Sporozoea*

Sous-classe des *Coccidia*

Ordre des *Eucoccidiidae*

Famille des *Plasmodiidae*

Genre *Plasmodium*

Espèces *P. falciparum* ; *P. malariae* ; *P. ovale* ; *P. vivax*.

Responsable de la forme la plus redoutable du paludisme, *Plasmodium falciparum* est plus répandu dans les régions tropicales chaudes. La prévention et le traitement du paludisme y sont devenus de plus en plus difficiles à cause de la chimiorésistance.

I.1.2.1.2. Cycle évolutif

Il se fait chez deux hôtes : chez l'homme ou s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonique et chez l'anophèle femelle ou se déroule le cycle sexué ou sporogonique.

➤ Cycle asexué ou schizogonie

Il se déroule en deux étapes : une étape hépatique et une étape sanguine.

- La première étape est encore appelée cycle exo-érythrocytaire ou schizogonie tissulaire. Elle se déroule dans le foie.

Lors de son repas de sang sur l'homme, l'anophèle femelle infesté inocule avec sa salive des sporozoïtes (éléments fusiformes allongés de 8 à 12 micromètres de diamètre). Le nombre de parasites inoculé est de plusieurs centaines. En trente minutes, ils gagnent le foie et disparaissent totalement de la circulation sanguine. Après sa pénétration dans l'hépatocyte, le

sporozoïte va se transformer en trophozoïte : élément arrondi de quelques micromètres de diamètre uninucléé. Chaque trophozoïte va s'accroître, son noyau va se diviser plusieurs fois et autour de chaque noyau fils se produit une condensation cytoplasmique donnant après environ une à trois semaines un schizonte mûr ou corps bleu multinucléé. Les corps bleus contiennent 10000 à 40000 noyaux, qui sont libérés par éclatement des hépatocytes, aboutissant à la formation de mérozoïtes, formes uninucléées qui vont passer dans les capillaires sinusoïdes puis dans la circulation sanguine, initiant la deuxième étape.

Certains mérozoïtes peuvent rester quiescents à l'intérieur des hépatocytes et sont appelés hypnozoïtes. Sous l'effet de facteurs non identifiés, ces hypnozoïtes en dormance reprendraient leur activité et déverseraient périodiquement des mérozoïtes dans le sang.

- La deuxième étape : elle est encore appelée cycle endo-érythrocytaire.

Chaque mérozoïte va pénétrer par endocytose dans une hématie et s'y transformer en trophozoïte. Il va prendre un aspect annulaire de 2 à 3 micromètres de diamètre, possédant un petit noyau et une bande de cytoplasme recourbé en fer à cheval. Ce trophozoïte grossit et son noyau se multiplie plusieurs fois de même que son cytoplasme pour donner un schizonte. Celui-ci arrivé à maturité (corps en rosace), va éclater libérant ainsi des mérozoïtes qui vont parasiter de nouvelles hématies et entamer ainsi de nouveaux cycles endo-érythrocytaires. C'est l'éclatement synchrone des corps en rosace toutes les 48 à 72h qui provoque des accès fébriles. Après plusieurs schizogonies sanguines, certains mérozoïtes vont donner naissance à des éléments sexués encore appelés gamétocytes mâles et femelles qui permettront la poursuite du cycle chez le moustique.

➤ Le cycle sexué ou sporogonie

Les gamétocytes sont absorbés par le moustique lors de son repas sanguin. Dans l'estomac du moustique, la fécondation des gamétocytes femelles va donner des œufs mobiles ookinètes qui vont traverser la paroi de l'estomac. Au niveau de sa face externe, ils vont donner des oocystes dans lesquels vont s'individualiser des sporozoïtes. L'éclatement des oocystes va libérer les sporozoïtes, qui gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. Ce sont ces sporozoïtes qui seront inoculés à l'homme lors d'une piqûre infectante.

La durée de ce cycle varie de dix à quarante jours en fonction de la température extérieure et de l'espèce plasmodiale.

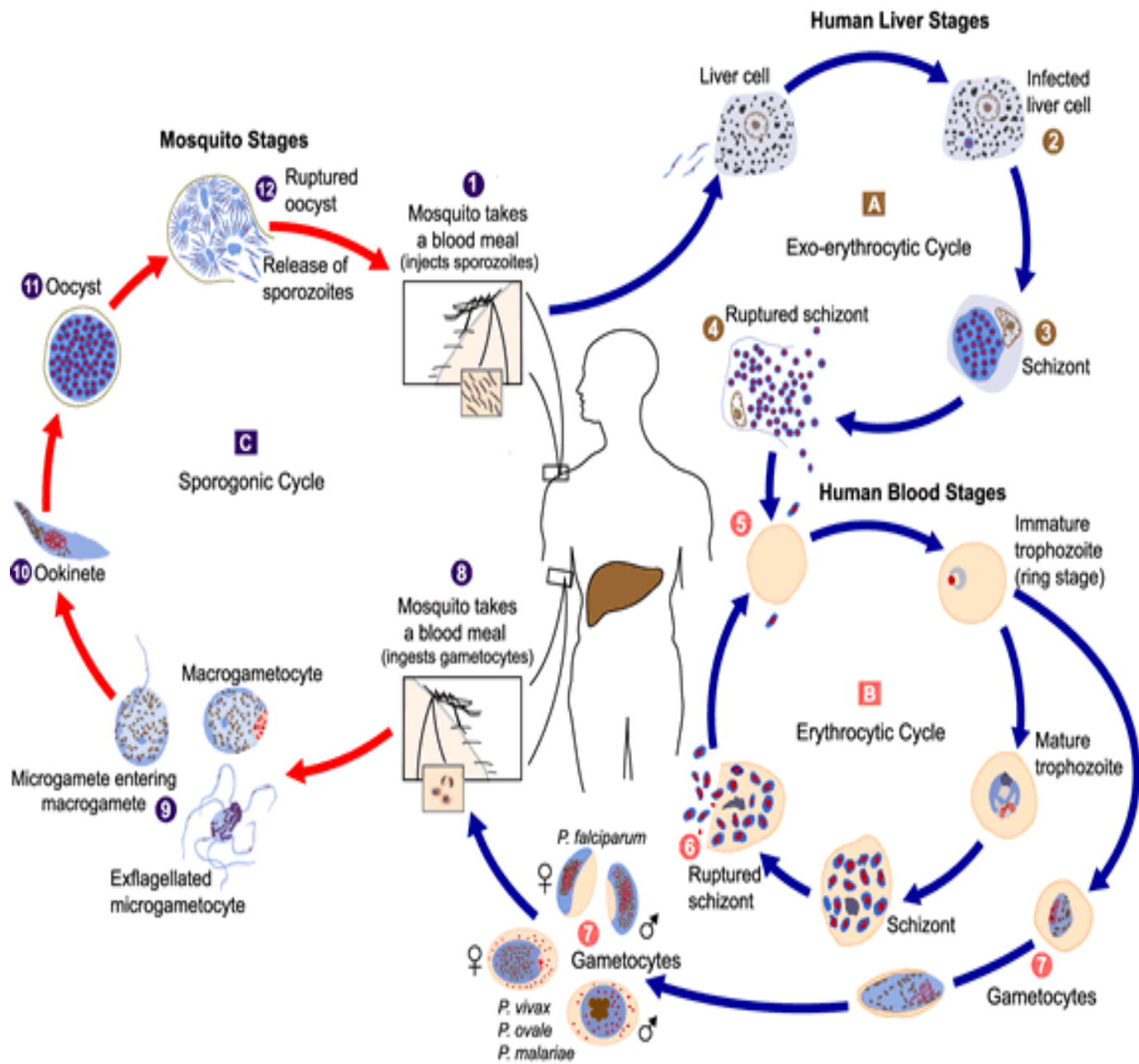


Figure 1 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

I.1. 2. 2. Transmission

I.1.2.2.1. Vecteurs

La transmission du paludisme est assurée par des Arthropodes appartenant à l'ordre des *Diptères*, au sous-ordre des *Nématocères*, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* et au genre des *Anopheles*.

La faune anophélienne au Sénégal est composée d'une vingtaine d'espèces (Diagne *et al.*, 1994). Mais comme dans la plupart des autres régions de l'Afrique sub-saharienne, l'essentiel de la transmission du paludisme est assurée par les espèces du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* (Bâ-Fall, 2000).

I.1.2.2.2. Faciès épidémiologiques

Un faciès est un ensemble de régions où les conditions climatiques et édaphiques imposent un certain mode de transmission qui se traduit par un certain niveau d'endémie de la parasitose et une incidence particulière de ses manifestations cliniques modulées par l'acquisition d'une immunité (Bâ-Fall, 2000).

Au Sénégal, deux grands faciès épidémiologiques sont représentés : le faciès tropical et le faciès sahélien.

Dans le faciès tropical, la transmission est saisonnière longue (4 à 7 mois). Du fait de l'acquisition rapide d'une immunité de prémunition, la mortalité palustre est entièrement concentrée chez les enfants de moins de 5 ans (Fontenille *et al.*, 1997 b ; Tape *et al.*, 1998).

Dans le faciès sahélien, la transmission est concentrée sur une courte période de l'année (1 à 3 mois). La mortalité palustre est encore élevée dans le groupe d'âge 5-9 ans (Faye *et al.*, 1993 ; Fontenille *et al.*, 1997 a ; Trape *et al.*, 1998).

On distingue également un faciès urbain où les gîtes d'anophèle sont rares en raison de la pression foncière et de la pollution des collections d'eau. La transmission du paludisme est très faible. La mortalité palustre est observée dans toutes les classes d'âges (Diallo *et al.*, 1998).

Le paludisme en zone urbaine fait depuis quelques années l'objet d'importantes études au Sénégal et dans d'autres pays africains. Selon la nature du site et la densité de l'urbanisation, la transmission est variable (Trape *et al.*, 1989). Elle est plus faible en ville surtout dans les quartiers centraux plus urbanisés que dans les quartiers périphériques. La ville de Dakar présente des niveaux de transmission et de prévalence du paludisme particulièrement faibles (Diallo *et al.*, 1998).

I.1.2.2.3. Modes de contamination

La contamination du paludisme peut se faire par trois voies :

- ✓ Contamination par l'anophèle femelle : c'est le mode habituel de transmission du paludisme qui nécessite la présence simultanée de trois éléments indispensables à savoir le *Plasmodium*, l'anophèle femelle et les êtres humains.
- ✓ Contamination par transfusion de sang : elle est réalisée par injection de sang parasité contenant des Plasmodiums résultant d'une simple schizogonie. Ce mode de contamination est plus rare que le précédent. Il est rencontré dans le paludisme de seringue observé notamment chez les toxicomanes et dans les paludismes post-transfusionnels.
- ✓ Contamination par voie transplacentaire : c'est une transmission maternofoetale qui est d'autant plus fréquent que les plasmodiums sont particulièrement abondants dans le placenta. Ce mode de transmission est rare dans les zones endémiques.

I.1.2.2.4. Les facteurs favorisant la transmission

La température, l'eau, l'humidité et les phénomènes anthropiques constituent parmi les facteurs entraînant la transmission.

- ✓ La température : le cycle sporogonique des plasmodiums nécessite une température optimale qui se situe autour de 27 °C.
- ✓ L'eau et l'humidité : Les eaux stagnantes constituent des gîtes larvaires et l'humidité influe sur la longévité du vecteur qui diminue quand elle baisse.
- ✓ Les facteurs anthropiques : Les modifications du réseau hydrographique (barrage et irrigation) entraînent la prolifération des vecteurs. Le développement des transports favorisé par les mouvements des populations, entraîne une dissémination des vecteurs.

Les conditions socio-économiques défavorables, liées à la pauvreté, peuvent favoriser la transmission (Seck, 2003)

I.1.3. Clinique

I.1.3.1. Chez les accès simples

Ils ne comportent pas de signe de malignité, mais peuvent à tout moment, évoluer vers l'accès pernicieux. La fièvre est le plus souvent continue vers 39°- 40°C, rémittente avec plusieurs cloches dans la journée. C'est au bout de quelques jours qu'elle devient intermittente. Les accès thermiques sont irréguliers, survenant à peu près tous les deux jours.

Les frissons et sueurs sont habituels et les signes d'accompagnement sont marqués en particulier : malaise générale intense, céphalées frontales, troubles digestifs.

I.1.3.2. Chez les accès pernicioeux

L'accès pernicioeux doit ses particularités symptomatiques à la multiplication intense des hématozoaires dans les capillaires cérébraux et viscéraux. Le début est souvent brutal, pouvant parfois succéder à un accès simple ou un paludisme viscéral évolutif non traité.

Le tableau clinique est celui d'un coma fébrile. La fièvre peut atteindre 40°C et même plus, le coma est plus ou moins profond. Des convulsions peuvent survenir surtout chez l'enfant de même que des troubles du tonus et des signes méningés.

A l'examen clinique, l'hépatomégalie est fréquente surtout chez l'enfant et la splénomégalie est absente deux fois sur trois.

Cet accès peut se compliquer d'insuffisance rénale organique parfois isolée et les surinfections pulmonaires sont fréquentes (Faye, 1994).

Tableau I : Définition d'un Paludisme à *P. falciparum* grave ou compliqué d'après l'OMS (2002)

Présence de formes sexuées de <i>Plasmodium falciparum</i> dans le sang (GE et frottis positifs) et d'une ou plusieurs des manifestations suivantes	
01	Neuropaludisme. (coma stade II ou plus)
02	Crises convulsives généralisées répétées (plus de 2 /4 heures, plus de 15 mn de phase post-critique)
03	Anémie grave (hémoglobine < 6g / dl. Et hématocrite < 20%)
04	Insuffisance rénale (diurèse < 400 ml ou 12 ml / kg / 24h ; créatininémie > 265 µmol / l)
05	Œdème pulmonaire (ou syndrome de détresse respiratoire)
06	Hypoglycémie (< 2 mmol / l ou 0,4 g / l)
07	Collapsus respiratoire
08	Hémorragie diffuse (ou CIVD)
09	Hémoglobinurie massive
10	Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol / l)
11	Obnubilation ou prostration (coma stade I)
12	Parasitémie élevée (> 5% chez un sujet non immun)
13	Ictère clinique
14	Hyperthermie (> 41°C) ou hypothermie (< 36°C)
SIGNES GENERAUX DE DANGER CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS <ul style="list-style-type: none"> - Incapacité de boire ou de téter - Vomissements incoercibles - Léthargie ou inconscience - Convulsions ou antécédents de convulsions - Malnutrition sévère 	

I.1.4. Diagnostic biologique

Beaucoup de méthodes sont utilisées pour diagnostiquer le paludisme et parmi celles-ci nous pouvons citer :

Le frottis sanguin, la goutte épaisse, le test Quantitative Buffy Coat (QBC), la Polymerase Chain Reaction (P. C. R.) et le test rapide de diagnostic.

I.1.4.1. Le frottis sanguin

On procède à un étalement monocellulaire en couche mince séchée. Le frottis sera ultérieurement fixé à l'alcool méthylique. Il répond à trois questions ; espèces plasmodiale en cause, stade parasitaire et parasitémie. L'inconvénient est l'augmentation du temps de lecture avec les parasitémies faibles.

I.1.4.2. La goutte épaisse

Elle nécessite 24 heures de séchage. Elle permet de concentrer les parasites s'ils sont peu nombreux sur une petite surface et permet ce qui permet de les voir plus facilement au microscope de dépister une parasitémie faible.

I.1.4.3. Le Q. B. C. test

Le sang recueilli sur un tube à hématocrite contenant l'acridine orange, est centrifugé à 1200 tours par minute pendant 5 minutes, puis l'identification est faite par lecture au microscope à fluorescence.

I.1.4.4. La P. C. R.

Elle repose sur la recherche de l'ADN parasitaire par amplification du matériel génétique. Cependant son coût élevé limite sa diffusion pour un diagnostic de routine

I.1.4.5. Les tests rapides de diagnostic (TRD)

Il s'agit de trousse de détection prêtes à l'emploi qui permettent en quelques minutes et sans matériel particulier de mettre en évidence la présence de Plasmodium.

C'est une méthode immuno-chromatographique qui utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes ou les enzymes du plasmodium et qui sont fixés sur des bandelettes de nitrocellulose.

I.1.5. Traitement

Il est basé sur l'utilisation de médicaments actifs sur les plasmodies. De nombreux médicaments peuvent être utilisés et selon leur mode d'action, on peut les classer en deux groupes : les schizonticides et les gamétocytocides.

I.1.5.1. Les schizonticides

Ils se concentrent fortement dans les hématies parasitées pour agir au niveau du noyau de l'hématozoaire plus exactement sur l'ADN dont ils inhibent la réplication, bloquant ainsi la schizogonie. On peut distinguer d'après leur mode d'action: Les schizonticides d'action rapide qui tuent le parasite dans l'hématie (Quinine, Artémisinine et dérivés, Chloroquine, Amodiaquine, halofantrine, Méfloquine) et les schizonticides d'action lente qui inhibent la croissance du parasite en bloquant la division de son noyau (Antifoliques et Antifoliniques). On peut les regrouper également en schizonticides naturels et de synthèse.

I.1.5.1.1. Les schizonticides naturels

➤ La quinine

Antipaludique naturel, c'est le médicament de première intention dans les indications d'urgence à cause de sa rapidité d'action.

➤ L'Artémisinine et ses dérivés (Ester et Ether)

- La dihydroartémisinine (DHA): il est indiqué dans l'accès palustre simple à *P. falciparum*.

- L'Artémether : elle agit en détruisant rapidement les plasmodiums par blocage de la digestion de l'hémoglobine.

- L'Artésunate : il est efficace contre les souches de *P. falciparum* et est dénué d'activité hypnozoïtique.

I.1.5.1.2. Les schizonticides de synthèse

➤ Les amino-4-quinoléines

- Chloroquine : c'est l'un des médicaments les plus utilisés jamais développés. C'était le premier médicament de première intention dans le traitement de l'accès palustre simple.

- Amodiaquine : elle inhibe la réplication de l'ADN après s'être intercalée au niveau des brins de la double hélice.

➤ Les Aryl-Amino-Alcools

- La Méfloquine : elle est active sur les schizontes érythrocytaires des quatre espèces plasmodiales humaines.

- L'halofantrine : il est utilisé uniquement en traitement curatif et déconseillé pour la femme enceinte et l'enfant de moins de 10 kg.

➤ Les Antimétabolites

- La sulfadoxine : elle est dirigée contre l'acide folique, c'est un inhibiteur du dihydroptéroate synthétase (dhps). Elle renforce l'action antimalarique de la pyriméthamine. Elle est à la fois un antibactérien et un antipaludique.

- La Pyriméthamine et le Proguanil : Ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (dhfr) empêchant ainsi la transformation de l'acide dihydrofolique en acide tetrahydrofolique conduisant à l'acide folinique, métabolite indispensable à la croissance du parasite intra globulaire.

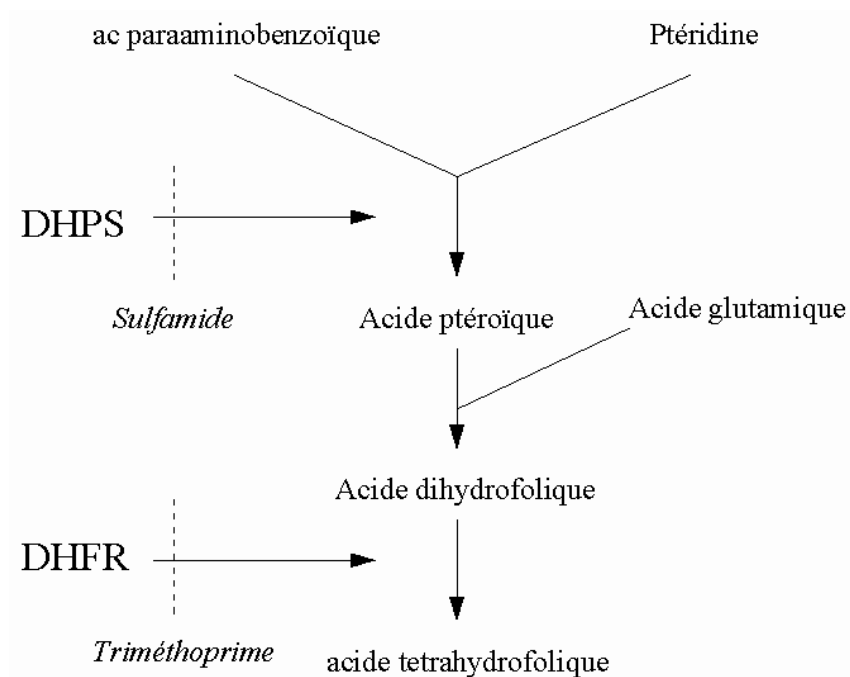


Figure 2 : Schéma du mécanisme d'action des antimétaboliques

➤ Les Associations schizontocides

- Sulfadoxine + Pyréméthamine : ou fansidar qui avec l'amodiaquine, était la seule disponible pour un traitement à coût acceptable dans l'accès présumé paludéen dans les pays où on a rencontré une résistance à la chloroquine.

- Sulfaméthopyrazine + Pyriméthamine
- Dapsone + Pyriméthamine
- Sulfadoxine + Pyriméthamine + Méfloquine
- Chloroquine + Proguanil
- Atovaquone + Proguanil

- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Artémether + Luméfantrine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquine

I.1.5.2. Les gamétocytocides

Ils sont actifs sur les gamétocytes sanguins, mais aussi sur les formes intra hépatiques. Ils empêchent la transmission de l'espèce plasmodiale au moustique par rupture du cycle sporogonique. Ce sont surtout les amo-8-quinoléines qui agissent en inhibant la transformation des gamétocytes du sang humain en gamètes chez l'anophèle. Elles permettent d'éviter la contamination des anophèles en stérilisant les réservoirs de parasites humains.

I.1.6. Chimiorésistance

I.1.6.1-Définition

Selon l'OMS la chimiorésistance dans le paludisme à *P. falciparum* est l'aptitude d'une souche parasitaire à continuer son développement malgré l'administration et l'absorption du médicament employé aux doses thérapeutiques recommandées.

C'est un phénomène aléatoire survenant naturellement au sein des populations plasmodiales à une fréquence très faible. Elle conserve à des degrés divers tous les médicaments antipaludiques mais constitue surtout actuellement en Afrique un problème particulièrement grave.

I.1.6.2. Méthodes d'étude de la résistance

Trois méthodes sont principalement utilisées pour analyser le phénomène de résistance. Il s'agit des tests *in vitro*, *in vivo* et de la biologie moléculaire (exemple : le génotypage).

➤ Le test *in vitro* : il consiste à mettre en culture des parasites en présence d'antipaludique à des doses croissantes et à étudier l'inhibition de leur multiplication. Les résultats sont obtenus après lecture au microscope ou après incorporation d'hypoxanthine, un des précurseurs des acides nucléiques.

➤ Le test *in vivo* : Il consiste à administrer à des sujets porteurs de plasmodiums et présentant un paludisme non compliqué, la dose ordinaire recommandée de l'antipaludique à étudier et de suivre son évolution pendant 14 à 28 jours. Ces tests ont été simplifiés et est standardisé par l'OMS¹.

➤ Le génotypage : c'est une approche technique importante car permet d'analyser les mutations des gènes impliqués dans le polymorphisme ou le métabolisme du parasite

I.1.6.3. Gènes impliqués dans la résistance

La base moléculaire dans la résistance aux antifolates, tels que la sulfadoxine-pyriméthamine a été bien caractérisée. La résistance de *P. falciparum* à ces molécules est principalement conférée à des mutations du gène dihydrofolate réductase (dhfr) et à des mutations additionnelles du gène dihydroptéroate synthétase (dhps) du plasmodium.

I.1.6.3.1. Le gène dhfr

Le gène dhfr a été séquencé en 1987 par l'équipe de Bzik à partir d'un clone de *P. falciparum* originaire de la Gambie et sensible à la pyriméthamine. Ce gène est localisé sur le chromosome 4 et existe sous forme de copie simple. Il a une taille d'environ 2,1 kb et il est constitué d'un seul exon et code pour une protéine enzymatique de 607 acides aminés.

I.1.6.3.2. Le gène dhps

Le gène dhps a été séquencé en 1994 par les équipes de Triglia et Brooks à partir de clones de *P. falciparum* cultivés au laboratoire. C'est un gène localisé sur le chromosome 8 et qui existe sous forme de copie simple. Il a une longueur de 1,1 kb et il code pour une protéine enzymatique de 176 acides aminés. L'enzyme dhps est produite tout au long de la phase asexuée du cycle de développement du parasite.

I.1.6.4. Mécanismes

➤ Mécanisme de résistance à la chloroquine :

L'activité la plus spectaculaire de la chloroquine est sa capacité à se concentrer à partir de niveaux nano molaires hors du parasite jusqu'à des niveaux milli molaires dans la vacuole digestive du trophozoïte érythrocytaire. C'est à ce niveau qu'elle inhibe la digestion de l'hémoglobine et qu'elle se fixe à l'hématine (Bray *et al.*, 1998).

La caractéristique commune des isolats résistants est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Il apparaît maintenant que la chloroquino-résistance implique une captation diminuée de la molécule (Ridley, 1998). Des mutations ponctuelles du gène *mdr1* de *Plasmodium falciparum* (*pfmdr1*) sont liées à la chloroquino-résistance en Afrique (Basco *et al.*, 1995 ; Bray & Ward, 1998). Lors d'expériences de recombinaison homologue, des gènes s'associant avec la chloroquino-résistance ont été retrouvés chez *P. falciparum* (Carlton *et al.*, 1998). Le gène *pfeg2*, situé sur le chromosome 7, code une protéine transmembranaire localisée dans la membrane de la vacuole parasitophore et dans

celle de la membrane digestive (Su *et al.*, 1997). Un polymorphisme complexe de ce second gène associé à la chloroquino-résistance est retrouvé dans les clones chloroquino-résistants africains de *P. falciparum* mais avec des exceptions (Durand *et al.*, 1999). Très récemment un troisième gène candidat, *pfcr*, situé sur le chromosome 7 à proximité de *pfcr2*, a été identifié et des mutations ponctuelles de ce gène sont retrouvées lors des échecs thérapeutiques de la chloroquine.

➤ Mécanisme de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine :

Ces dernières années, il a été montré que des mutations sur des gènes de *P. falciparum* pouvaient conférer la résistance aux antifoliques, ouvrant la voie à une épidémiologie moléculaire supposée plus performante que les études *in vivo* et *in vitro*.

- Les mutations du gène *dhfr*

Les mutations ponctuelles du gène dihydrofolate réductase (*dhfr*) sont les bases moléculaires de la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine (Basco *et al.*, 1995). La substitution dénommée S108N est la mutation primaire associée à la résistance à la pyriméthamine ou au cycloguanil en Afrique et en Asie du Sud-Est (Nzila-Mouda *et al.*, 1998). Les mutations additives les plus fréquentes sont N51I et C59R (Basco *et al.* 1995). Une simple substitution Asn en 108 ou Thr en 108 sur la *dhfr* recombinante du parasite réduit l'affinité de la molécule sans affecter le fonctionnement de l'enzyme vis-à-vis de son substrat naturel. Les mutations multiples diminuent l'efficacité de l'enzyme sur le dihydrofolate, ce qui suggère que des mutations additionnelles soient défavorables aux parasites en l'absence de pression médicamenteuse (Sirawaraporn *et al.*, 1997). La présence de mutation S108N seule ou associée à une mutation du codon 59 n'est pas suffisante pour entraîner une résistance par contre la présence de trois mutations au niveau du gène *dhfr* entraîne un échec thérapeutique tardif ou précoce.

Dans les conditions physiologiques, la concentration sanguine en folates peut influencer l'effet de la sulfadoxine, ceci pouvant expliquer les échecs du fansidar sur des isolats de *P. falciparum* avec la seule mutation S108N.

- Les mutations du gène *dhps*

Il a été initialement évoqué que des mutations sur le gène de la dihydroptéroate synthétase (*dhps*) la cible des antifoliques, pourraient être responsables de la résistance à la sulfadoxine (Triglia *et al.*, 1999). Des mutations ponctuelles des codons 436, 437, 540, 581, ou 613 sont associées à des diminutions de sensibilité à la sulfadoxine (Basco *et al.*, 1995)..

I.1.6.5. Chimiorésistance multiple

On entend par paludisme polychimiorésistant, une résistance à plusieurs antimalariques observée chez *P. falciparum*. Cette résistance peut être croisée ou simultanée. La résistance simultanée est principalement la conséquence d'une utilisation simultanée importante de plusieurs antipaludiques induisant une forte pression sélective. Ainsi en Asie du Sud-est, la résistance à la chloroquine s'est complétée d'une résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine. Par contre en Afrique de l'Ouest, la résistance à la chloroquine et aux antifoliniques n'est pas encore associée (Le Bras *et al.*, 1998). La résistance croisée entre antipaludiques est un phénomène lié à la communauté de leurs modes d'action et sans doute de leurs mécanismes de résistance. Ainsi une corrélation étroite est observée entre les sensibilités au cycloguanil et à la pyriméthamine de plusieurs isolats africains.

I.1.6.5. Les facteurs favorisant la chimiorésistance

Les mouvements de population humaine et anophélienne et la pression médicamenteuse constituent les principaux facteurs qui favorisent la chimiorésistance.

- La pression médicamenteuse : elle sélectionne les souches résistantes et est accentuée par l'automédication avec souvent des posologies infra thérapeutiques.
- Les mouvements de populations humaine et anophélienne : l'apparition de la chimiorésistance chez *P. falciparum* s'observe et se répand plus vite chez les sujets non immunisés ou faiblement immunisés lorsqu'ils sont infectés en zone d'endémie.
- Le degré d'immunité de la population : s'il est élevé, l'apparition de la résistance est retardée.
- L'existence ou l'apparition d'un bon vecteur dans la zone impaludée.

I.1.7. Polymorphisme génétique de *Plasmodium falciparum*

I.1.7.1. Description

Le polymorphisme chez *Plasmodium falciparum* a tout d'abord été mis en évidence par l'étude des iso enzymes, puis par des anticorps monoclonaux. Ceci a permis de sérotyper des souches de culture (Mc Bride *et al.*, 1982) ou des souches prélevées chez des malades en zone d'endémie (Babiker *et al.*, 1991) et de mettre en évidence un polymorphisme considérable. Plusieurs types d'événements ont été décrits : mutations ponctuelles, différence dans la séquence primaire des motifs répétitifs, accumulation de mutations ponctuelles conduisant à la constitution de familles alléliques, variation du nombre de répétitions, réarrangements

chromosomiques provoquant des délétions partielles ou totales des gènes, recombinaison intra chromosomique ou intra génique (Kemp *et al.*, 1990).

A ce polymorphisme de type alléliques, s'ajoute le phénomène de la variation antigénique par lequel le parasite expose plusieurs leurres d'un même antigène au cours d'une même infection (Hamza *et al.*, 1995). La variation antigénique met en jeu un répertoire de gènes codant pour l'antigène variant exposé à la surface du pathogène. Il permet une réponse adaptative plus rapide que ne le permet le polymorphisme alléliques et ou la diversité génétique engendrée par la reproduction sexuée.

I.1.7.2. Analyse du polymorphisme

Les récents progrès des techniques de la biologie moléculaire ont permis de mesurer toute l'étendue du polymorphisme de l'espèce *P. falciparum*, polymorphisme beaucoup plus large que ne l'avaient laissé entrevoir les études plus anciennes utilisant des méthodes plus classiques d'investigation (Niang, 2001).

La diversification alléliques des gènes de *P. falciparum* est favorisée par la présence de structure répétitive. En effet, le génome de *P. falciparum* présente une grande tolérance à l'insertion de séquences répétitives et variables. Ces structures sont dynamiques, elles évoluent plus rapidement que les séquences uniques permettant l'émergence rapide de nouvelles formes alléliques.

Un très grand nombre de gènes polymorphes utilisables comme marqueurs génétiques ont été identifiés chez *P. falciparum* et parmi eux on peut citer : dhfr et qui a été utilisé dans cette étude pour préciser les mutations observées.

I.2. Technique de réaction de polymérisation en chaîne

I.2.1. Historique

C'est une technique d'amplification sélective d'une séquence d'ADN comprise entre deux amorces d'orientation inverse et de séquence connue. Elle a été mise au point par Karry Mullis en 1985 (Mullis, 1990) qui voulait retrouver une mutation ponctuelle. Ainsi il a réalisé une réaction proche du séquençage en utilisant des didésoxynucléotides (ddNTP) marqués radio activement. L'expérience devait se faire dans quatre tubes qui devraient contenir chacun de l'ADN polymérase, des amorces oligonucléotidiques et un des quatre ddNTP. Ainsi après fixation du ddNTP, il était possible après autoradiographie, d'identifier le nucléotide adjacent à l'amorce. Puis Mullis se proposa une deuxième amorce complémentaire du second brin

parental afin d'avoir un test plus fiable. S'étant rendu compte de la présence de dNTP en de très faibles quantités dans les solutions d'ADN, il a voulu les diminuer en faisant réagir l'ADN polymérase dans un premier temps. Cette réaction devait allonger certaines amorces qui auraient perturbé les résultats selon Mullis. Mais ayant poursuivi son raisonnement, il s'est rendu compte que ces fragments néoformés n'auraient été rien d'autre que les copies des deux brins initiaux. Il y'aurait eu duplication des séquences d'ADN initiales. Des travaux ont montré que l'amplification était effective. A partir d'un fragment, on aurait théoriquement 2^n fragments après n cycles. La PCR, une méthode simple et rapide, était née. Elle connaîtra diverses applications et de nombreux protocoles adaptés à différents matériaux seront mis au point.

I.2.2. Principe de la PCR

Dans la cellule, la duplication a lieu juste avant la mitose. L'ADN polymérase intervenant, ne fait qu'allonger des chaînes de nucléotides à partir d'un double brin. Après la séparation des deux brins d'ADN (dénaturation), des fragments d'ARN appelés amorces s'apparient (ou s'hybrident) à leurs séquences complémentaires au niveau de chaque brin d'ADN. Puis l'ADN polymérase les allonge par ajout de nucléotides aboutissant ainsi à la formation d'une copie complémentaire de chaque brin d'ADN. On a ainsi deux nouvelles molécules identiques à la molécule de départ (Darnel *et al.*, 1988). Une polymérisation est ainsi faite.

La PCR est basée sur ce même principe. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 5' de deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Sous l'action de l'ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5' → 3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. Une réaction de PCR correspond à une succession d'environ 30 cycles comportant chacun trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée (figure 2).

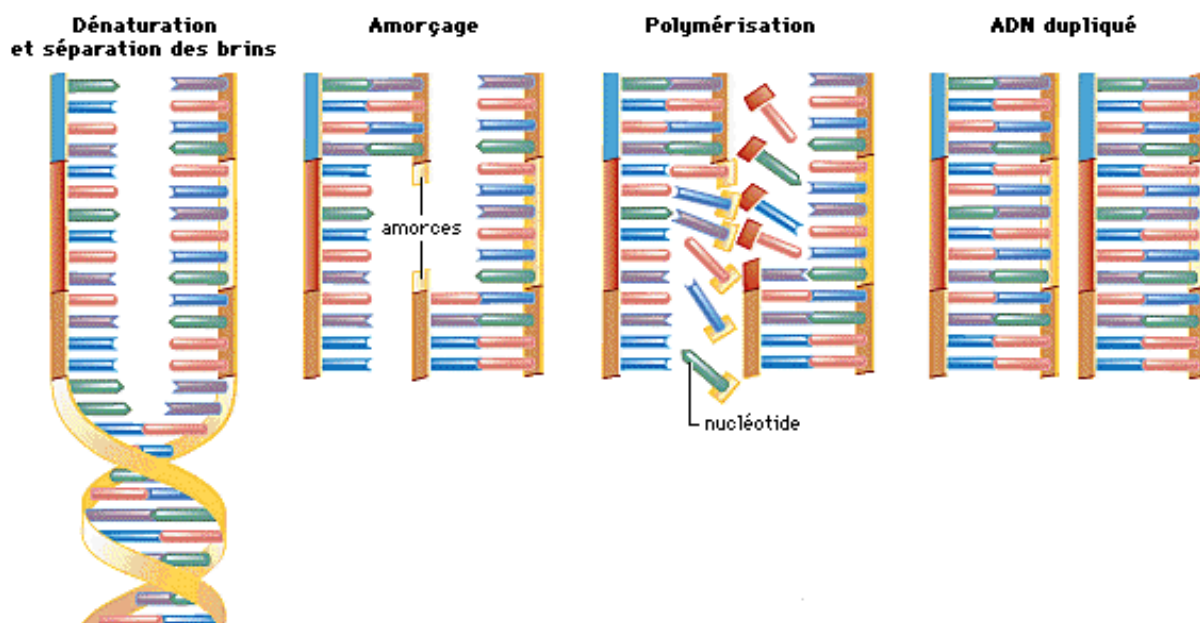


Figure 3 : Schéma du principe de la PCR

I.2.3. Composantes de la PCR

Pour faire une bonne PCR, les éléments nécessaires sont : L'ADN, les amorces, l'enzyme de polymérisation, le tampon, les nucléotides et l'eau.

I.2.3.1. L'ADN

Généralement sous forme de double brin contenant le fragment à amplifier, il constitue la cible à partir de laquelle se feront les copies. Les origines de cet ADN peuvent être multiples : tissus frais, tissus conservés l'état sec, tissus sec conservés à -70°C , tissus conservés dans de l'alcool, échantillon de sang ... (Scott *et al.*, 1993).

L'ADN ne doit pas comporter de rupture au niveau des séquences à amplifier. Il doit être pur c'est-à-dire être débarrassé des protéines qui lui sont associées. Ces impuretés peuvent conduire à des amplifications parasites dues aux ARN ou à une baisse du rendement par le fait des protéines associées comme les histones (Kaplan & Delpech, 1993 ; Delpech *et al.*, 1999).

Il peut être associé à des inhibiteurs de la Taq polymérase soit lors de son extraction, soit lors de sa conservation. Des lavages au chloroforme permettent d'éliminer le phénol. Des dilutions de solution d'ADN permettent de réduire l'effet de ces produits (Ju & Charron, 1992 ; Jackson *et al.*, 1993 ; Paskewitz *et al.*, 1993 ; Delpech *et al.*, 1999).

I.2.3.2. Les amorces

Ou primers en anglais, ils sont au nombre de deux (amorce sens et amorce antisens) et sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases chacun, capables de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Elles doivent avoir des quantités (G et C, A et T) sensiblement égales afin d'éviter la formation de structure secondaires comme les boucles (Innis & Gelfand, 1990 ; Taylor, 1993). La séquence de l'une des amorces ne doit pas être complémentaire à l'autre pour éviter l'hybridation entre amorces (Bogard & Lamoril, 1998). Les fortes concentrations doivent être évitées car elles entraînent des amplifications de séquences non ciblées (Innis & Gelfand, 1990).

I.2.3.3. L'enzyme

La plus utilisée est la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistant extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* qui vit dans les sources thermales entre 80° C et 90°C (Kaplan & Delpech, 1993). Sa température optimale d'action varie entre 65°C et 72°C (Taylor, 1993) et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure. A cette température, la Taq polymérase est capable de juxtaposer 100 nucléotides par seconde. Les faibles et fortes températures ont pour effet de diminuer l'activité de la Taq polymérase.

Il faut savoir que les Taq polymérases d'origines différentes, se comportent différemment (Innis & Gelfand, 1990 ; Meunier & Grimont, 1993) et ceci doit être pris en compte si l'on veut utiliser la technique PCR. Certains auteurs préfèrent, si le nombre d'échantillons à traiter est petit, ajouter la Taq polymérase après le premier cycle de dénaturation pour avoir un rendement maximum (Kapland & Delpech, 1993).

I.2.3.4. Les nucléotides

Les solutions de travail sont constituées d'un mélange équimolaire des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) groupés sous le nom de dNTP (désoxy Nucléotides Triphosphates). Ce type de mélange permet d'éviter les erreurs d'incorporation par la Taq polymérase (Innis & Gelfand, 1990). Il est préférable d'utiliser les faibles concentrations en nucléotides car elles ont pour effet de minimiser les mauvais appariements des amorces à des sites non ciblés.

I.2.3.5. Le tampon

Le tampon est optimisé en fonction des paramètres de la PCR. Sa composition est très variée et en général il se compose de Tris-HCL (Tris hydroxyméthyl amino méthane), de Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$), de Chlorure de Potassium (KCl), de détergents et de gélatine.

I.2.3.5.1. Le Tris HCl

Il régule le pH de la réaction qui intervient au niveau de l'activité de la Taq polymérase. Le pH du Tris HCl décroît de 0,03 unité par degré lorsque la température augmente, permettant ainsi d'obtenir à 72 °C la valeur d'activité optimale de la Taq polymérase (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993).

I.2.3.5.2. Le chlorure de Magnésium

Les Mg^{2+} fournis par le Chlorure de Magnésium sont nécessaires à l'activité et à la fidélité de la Taq polymérase et affectent pratiquement tous les autres paramètres de la réaction : hybridation, dénaturation, spécificité, formation de dimères d'amorces. Ils peuvent interagir avec les nucléotides, mais aussi, chélatants comme l'EDTA. De ce fait, ils deviennent inaccessibles à la Taq polymérase qui est alors inhibée, entraînant ainsi une baisse du rendement de la synthèse. Les protéines et les acides nucléiques peuvent également fixer le $MgCl_2$ (Elie, 1993) le rendant inaccessible par la Taq polymérase, d'où l'intérêt d'éviter les très fortes concentrations en ADN cible.

I.2.3.5.3. Le Chlorure de potassium

Les sels ont un rôle très important car ils facilitent l'hybridation des amorces malgré leur action inhibitrice sur la Taq polymérase, d'où l'intérêt d'optimiser sa concentration dans le milieu (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993 ; Kaplan & Delpech, 1993).

I.2.3.5.4. Les détergents et la gélatine

les détergents tels que le Triton x 100, le NP40 ou le Tween 20 sont parfois ajoutés dans le milieu pour stabiliser la Taq polymérase et lui confèrent le maximum d'activité car celle-ci, fortement hydrophobe, a tendance à précipiter en solution aqueuse (Innis & Gelfand, 1990 ; Kocher & Wilson, 1993).

La gélatine a l'avantage quant à elle de supporter les températures de dénaturation.

I.2.3.6. L'eau

L'eau a un rôle très important car elle permet de diluer le tampon en réduisant sa concentration ionique.

I.2.4. Conditions de la réaction

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation. Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans une solution appelée « mix » qui sera soumise aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

I.2.4.1. Dénaturation

Le tube contenant le « mix » est chauffé entre 30s et 1mn à 94 °C ou pendant 15s à 97 °C (Innis & Gelfand, 1990 ; Paskewitz & Collins, 1990 ; Taylor, 1993) pour séparer les deux brins de l'ADN : l'ADN est dit dénaturé. Les mauvaises amplifications peuvent résulter d'une dénaturation incomplète. Pour cette raison, une première phase de dénaturation plus longue de 5 mn est incluse. Elle ne se répète pas tout au long de l'amplification. Elle permet de s'assurer que tout l'ADN cible se trouve sous la forme simple brin. Avec des temps de dénaturation très long, on assiste à une baisse du rendement puisque l'effet du plateau est très vite atteint. L'effet de plateau se traduit par une inactivation d'une grande partie de la Taq polymérase, une raréfaction des nucléotides et des amorces.

I.2.4. 2. Hybridation

Elle a lieu lors du refroidissement, la température est rapidement abaissée à 55 °C. Les amorces reconnaissent leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur son brin respectif. Cette réaction dure 1 mn pour laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement.

Le refroidissement doit se faire très rapidement afin d'éviter la possible renaturation de l'ADN cible c'est-à-dire la ré-association des deux brins, et de permettre aux amorces qui sont en très fortes concentrations de s'hybrider à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible.

I.2.4.3. Elongation

Elle se fait par une élévation de la température et elle est optimale à 72 °C. Lorsque les séquences à amplifier sont très longues, il est nécessaire d'allonger le temps d'extension de 1 à 3 mn. Une phase d'extension plus longue (5 à 10 mn) a lieu après le dernier cycle. Elle permet d'obtenir une meilleure amplification après une raréfaction de substrats (nucléotides et amorces) et une saturation de la Taq polymérase qui a été inactivée pour une grande partie par la chaleur (effet plateau).

I.2. 5. Détection et analyse des produits de PCR

I.2.5.1. Migration électrophorétique

Les fragments d'ADN après amplification par Nested PCR, sont séparés par électrophorèse. Celle-ci est la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. En PCR, les fragments obtenus sont analysés sur gels d'agarose ou d'acrylamide. Lors de la polymérisation, ces gels définissent des mailles plus ou moins régulières entre lesquelles passent les molécules à des vitesses différentes selon leur taille. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport aux puits d'inclusion sera importante. A l'opposé, les fragments de petite taille auront une distance de migration plus grande. La détermination précise des tailles des fragments séparés par électrophorèse, est effectuée en faisant migrer un marqueur de taille (ou poids moléculaire) en parallèle avec les échantillons à analyser.

I.2.5.2. Révélation des produits de PCR

Les produits de PCR sont visualisés après marquage ; les méthodes de marquage les plus sensibles sont celles qui utilisent soit du bromure d'éthidium, soit du nitrate d'argent, soit des radioisotopes.

- Marquage au bromure d'éthidium : c'est une molécule qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN double brin. Il donne une fluorescence orange en présence de rayons ultraviolets, cette fluorescence est plus prononcée dans les zones où sont concentrées les molécules d'ADN.

- Marquage au nitrate d'argent : La coloration au nitrate d'argent, plus sensible que celle au bromure, permet de conserver le gel coloré.

Marquage aux radioisotopes : Les nucléotides ou les amorces utilisées dans le « mix » sont marquées avec des radioisotopes (soufre 35 et phosphore 32) ; La révélation se fera par autoradiographie.

I.2.6. La digestion enzymatique ou PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restricted Fragment Length Polymorphism)

La digestion des produits de la PCR est réalisée au moyen d'enzymes de restrictions. Découvertes en 1973 et isolées à partir de microorganismes le plus souvent les Bactéries, les enzymes de restriction sont de véritables outils de laboratoire utilisés pour couper l'ADN. Elles sont capables de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10 paires de bases et de cliver l'ADN au site reconnu. Plusieurs centaines d'enzymes de restrictions ont été

caractérisées : elles reconnaissent une grande variété de sites de coupure et permettent d'établir une carte de restriction de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui va entraîner, après digestion enzymatique, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.

I.2.7. Contaminations en PCR

Les premières PCR ont montré très souvent des amplifications au niveau des témoins négatifs (théoriquement dépourvus d'ADN) donnant ainsi naissance à de faux positifs. Ces derniers apparaissent très souvent après une longue utilisation des mêmes produits d'incubation qui, au cours du temps, ont été contaminés par de l'ADN pouvant provenir soit des aérosols lors de l'ouverture des tubes, soit des parois internes des pipettes ayant servi à l'extraction ou à la distribution des produits de PCR (Kaplan & Delpech., 1993). Pour minimiser les contaminations, il est conseillé de préparer un « mix » et de réaliser des incubations dans des pièces différentes de celle où sont analysés les produits d'amplifications et de celle où est extrait l'ADN. Le travail sous une hotte permet de purifier l'air ambiant du grand nombre d'aérosols contaminant qu'il contient. L'irradiation des lieux par des UV, l'aliquotage en de petits volumes de tous les produits de l'incubation, la distribution de l'ADN en dernier lieu permettent de minimiser considérablement les contaminations. Les pipettes et la hotte sont nettoyées à l'acide chlorhydrique qui détruit l'ADN.

MATERIEL ET METHODES

II.1. Cadre d'étude

Le centre de santé SAINT DOMINIQUE se trouve dans le département de Pikine, banlieue distante d'environ 9 Km du centre de la ville de Dakar, capitale du Sénégal. Ce centre de santé communément connu sous le nom de DOMINIQUE, relève du district sanitaire du département de Pikine.

II.1.1. Historique du centre de santé

Le centre de santé Saint Dominique doit son nom à un célèbre photographe qui avait ses studios à proximité de la structure sanitaire. En réalité, c'est en 1957 qu'il a été créé. Au début, il s'agissait d'une structure avec seulement deux salles et un personnel composé d'un infirmier et de deux sages femmes.

Vers les années 1970, Dominique va connaître une extension qui s'est terminée en 1982 avec la coopération Sénégal-Belge.

II.1.2. Situation géographique

Le centre de santé Dominique se situe à cinq cent mètres (500 m) de l'entrée principale de Pikine. Il est au cœur du quartier dénommé Gazelle. Il est délimité au Nord par la route « Talli-Boumack » au Sud et à l'Est par le quartier Gazelle et à l'Ouest par la route longeant le Centre de Promotion et Réinsertion Social de Pikine (C.P.R.S.).

II.1.3. Missions

A l'instar des autres centres de santé, Dominique a pour mission de satisfaire les besoins sanitaires de la population de son secteur.

II.2. Matériel et réactifs de laboratoire

II.2.1. Matériel

- Sang sur papier filtre
- Micropipettes 10, 100, 200 et 1000 microlitres
- Tubes eppendorf 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ml
- Cônes pour micropipettes
- Papier para film
- Balance de précision
- Gants, blouse

- Bac à électrophorèse et peignes
- Four à micro-onde
- Centrifugeuse
- Générateur de courant électrique
- Vortexeur
- Trans-luminateur à UV
- Thermocycleur
- Hotte à flux laminaire
- Portoirs pour tubes eppendorfs
- Thermomètre
- Plaque PCR
- Cuve à migration

II.2.2. Réactifs

- Eau distillée
- Méthanol
- Chlorure de Magnésium 25 mM
- Primers ou amorces (dhfr1 et dhfr2)
- Bromure d'éthidium
- Buffer 10X
- Tampon TAE 1X
- Marqueurs de poids moléculaire
- Taq polymérase
- dNTP 100 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- Poudre d'agarose
- Bleu de bromophénol

II.3. Méthodes d'étude

En vu de réduire les risques de contamination des échantillons, la préparation des solutions de réactifs et les activités d'extraction et d'amplification de l'ADN étaient faites dans des salles distinctes. La première servait uniquement à la préparation et à la distribution des mélanges de réactifs tandis que dans la seconde salle se faisait l'extraction et le stockage de l'ADN

plasmodiale. Les amplifications et la révélation des produits de PCR sur Gel d'agarose sont effectuées dans une troisième salle.

II.3. 1. Extraction d'ADN

Les méthodes d'extraction de l'ADN varient en fonction du matériel à traiter et des objectifs de l'étude (Maniatis *et al.*, 1982). Dans notre manipulation, l'ADN parasite est extrait selon une méthode très simple. C'est la méthode utilisant le méthanol qui se déroule de la manière suivante :

- 1- Couper approximativement 3 mm³ de confettis imprégnés de sang
- 2- Le transférer dans un micro tube de 1.5 ml
- 3- Ajouter 50-100 microlitres de méthanol dans le tube
- 4- S'assurer que le méthanol a totalement immergé le papier confettis
- 5- Laisser incuber la température ambiante pendant 15 mn
- 6- Puis enlever le méthanol
- 7- Sécher le confetti sous vide ou à l'air libre
- 8- Après séchage, ajouter 50 microlitres d'eau distillée
- 9- Chauffer pendant 15mn entre 95 et 100 °C à l'aide d'une plaque chauffante
- 10- Agiter périodiquement au vortex chaque 5mn afin de faciliter l'extraction de l'ADN plasmodial.
- 11- Le produit ainsi obtenu est utilisé directement pour la PCR ou gardé à -20 °C.

II.3. 2. Amplification du gène *pfdhfr*

Au cours de notre étude, nous avons amplifié le gène au moyen d'amorces localisées dans les régions dont les séquences sont consignées dans le tableau II qui suit.

Tableau II : **Description des amorces du gène *dhfr* de *P. falciparum*.**

Gènes	Amorces	Séquences	Etapas
dhfr1	Sens (F1)	5'-ATG GAACAAGTCTGCGACGTT TTC-3'	1 ^{ère} amplification
	Antisens (R1)	5'-ATGACATGTATCTTTGTCATCATT-3'	
dhfr2	Sens (F2)	5'-ATGGAACAAGTCTGCGACGTT TTC-3'	2 ^{ème} amplification
	Antisens (R2)	5'-ATTGTTACTAGTATATACATCGCT-3'	

Les amplifications de la première PCR sont réalisées dans un volume de 50µl contenant :

- 2µl d'ADN

- 5µl de buffer 10X
- 3µl de MgCl²
- 2µl de primer R1
- 2µl de primer F1
- 5µl de dNTP
- 0,5µl de Taq polymérase
- 30,5µl d'eau distillée

L'amplification a été faite selon le programme suivant :

95°C 5 mn : Dénaturation	
95°C 30 s	} 35 cycles
56°C 45 s	
62°C 1 mn	
62°C 10 mn : Elongation	

Pour la Nested PCR, le volume final du « mix » est identique à celui de la première mais la différence se trouve au niveau de la quantité d'ADN utilisée. On prend 1µl de l'ADN de la première amplification et 31,5µl d'eau distillée. Et le programme est aussi le même que la première.

II.3. 3. Migration électrophorétique

Dans notre étude, nous avons utilisé le gel d'agarose à 2%. Pour cela, 3g de poudre d'agarose sont dissous dans 150ml de TAE (tampon) à 1% et chauffés au four micro-onde. Après dissolution complète de la poudre d'agarose, nous avons ajouté 3µl de Bromure d'Ethidium (BET). La solution obtenue est versée dans un bac à électrophorèse avec des peignes qu'on laisse polymériser pendant 30 mn. Le gel obtenu est placé dans une cuve à migration remplie de TAE à 1 %. Dans le premier puit est déposé 5µl du marqueur de taille et dans les autres sont déposés les échantillons d'ADN testés mélangés avec 3µl du bleu de bromophénol. Ces derniers migrent sous un voltage de 60 volts et une intensité de 150 mA pendant 30 mn. Après migration, le gel est visualisé sous rayons UV. Les bandes d'ADN apparaissent avec une fluorescence grâce au BET qui est une molécule qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN double brin.

Une migration a été effectuée après chaque amplification

II.3.4. La digestion enzymatique

Dans notre travail nous avons effectué une PCR RFLP et nous avons utilisé trois enzymes de restriction que sont : la BsrI, la Tsp509I et la XmnI. Ces enzymes permettent de savoir s'il y'a réellement des mutations au niveau des codons 108, 51, et 59 respectivement. Le tableau ci dessous illustre le niveau de mutation de chaque codon.

Tableau III : Enzymes de restriction avec leurs sites de restriction

Positions	Codons sauvages	Enzymes	Codons mutés
51	AAT→Asn	XmnI	ATT→Ile
59	TGT→Cys	Tps509I	CGT→Arg
108	AGC→Ser	BsrI	ACC→Thr AAC→Asn

Si le gène est sauvage l'enzyme coupe au niveau du site reconnu. Les gènes mutants ne sont pas coupés.

Le protocole utilisé est le suivant : nous avons préparé un « mix » dont les constituants et leurs volumes sont consignés dans les tableaux IV, V et VI ci-dessous. Puis nous avons fait une incubation du « mix » pendant 6 heures à une température définie.

Tableau IV : Condition pour une digestion au niveau du codon 51

Constituants		Volumes
ADN	Produit PCR	05µl
Enzyme	Tsp509I	0.5µl
Tampon	NEB1	01µl
Eau	Eau distillée	3.5µl
Total		10µL
Température d'incubation		65 °C

Tableau V : **Condition pour une digestion au niveau du codon 59**

Constituants		Volumes
ADN	Produit PCR	05µl
Enzyme	Xmnt1	0.5µl
Tampon	NEB3	01µl
Eau	Eau distillée	3.5µl
Total		10µl
Température d'incubation 65 °C		

Tableau VI : **Condition pour une digestion au niveau du codon 108**

Constituants		Volumes
ADN	Produit PCR	05µl
Enzyme	Brs1	0.5µl
Tampon	NEB3	01µl
Eau	Eau distillée	3.5µl
Total		10µl
Température d'incubation 65 °C		

Après la digestion enzymatique, une dernière migration électrophorétique est réalisée. Celle-ci s'est faite de la même manière que la précédente.

II.3.5. La révélation

Les produits de la digestion enzymatique après migration sont visualisés au rayon ultra violet. Puis une photo de cette révélation est faite afin de confirmer ou d'infirmer les mutations suggérées. Pour cela nous avons utilisé deux contrôles, un mutant et un sauvage.

RESULTATS

III.1. Caractéristique de la population d'étude

Dans notre étude, 17 patients ont été recrutés pendant la saison des pluies c'est-à-dire de juillet à septembre de l'année 2003. Nous n'avons pas tenu compte du sexe, de l'âge ni de l'état des femmes ; ces patients présentaient tous une goutte épaisse positive et une parasitémie supérieure ou égale à 1000 parasites par microlitre de sang. Les prélèvements de sang ont été effectués au niveau de la pulpe du doigt.

III.2. Amplification du gène dhfr

La PCR a été réalisée chez les 17 sujets et la proportion d'échantillons amplifiés avec succès en utilisant les primers du gène dhfr était de 100%. Un exemple de migration électrophorétique de ces échantillons sur gel d'agarose à 2% après coloration au bromure d'éthidium est représenté sur la figure 3 ci-dessous.

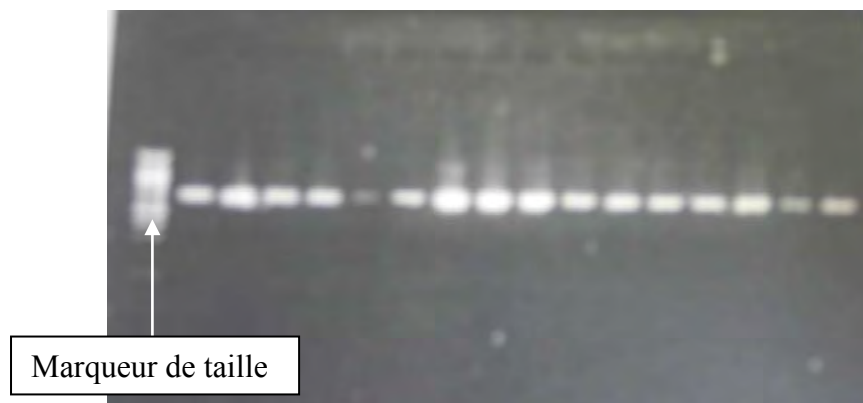


Figure 4 : Migration électrophorétique des échantillons sur gel d'agarose

III.3. Digestion enzymatique

La digestion des produits de PCR a été révélée par une autre migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% avec bromure d'éthidium et visualisée au rayon ultra violet. Les bandes de la même taille que le témoin sauvage correspondent aux souches sauvages, par contre celles qui ont la même taille que le témoin mutant correspondent aux souches mutantes. Et ceci est illustré par la photo suivante.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont été représentés sous forme d'histogrammes.

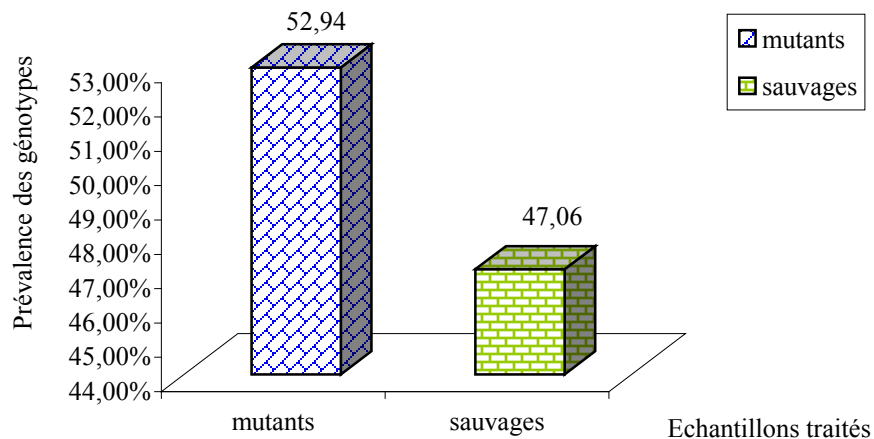


Figure 5 : **Comparaison entre pourcentage de mutants et sauvages**

Sur dix sept (17) isolats étudiés, les neuf (9) sont de génotype mutant ce qui représente un taux de 52,94% et les huit (8) autres sont de génotype sauvage correspondant à 47,06% (figure 5). La moitié des isolats étudiés ont donc révélé une ou plusieurs mutations au niveau du gène dhfr.

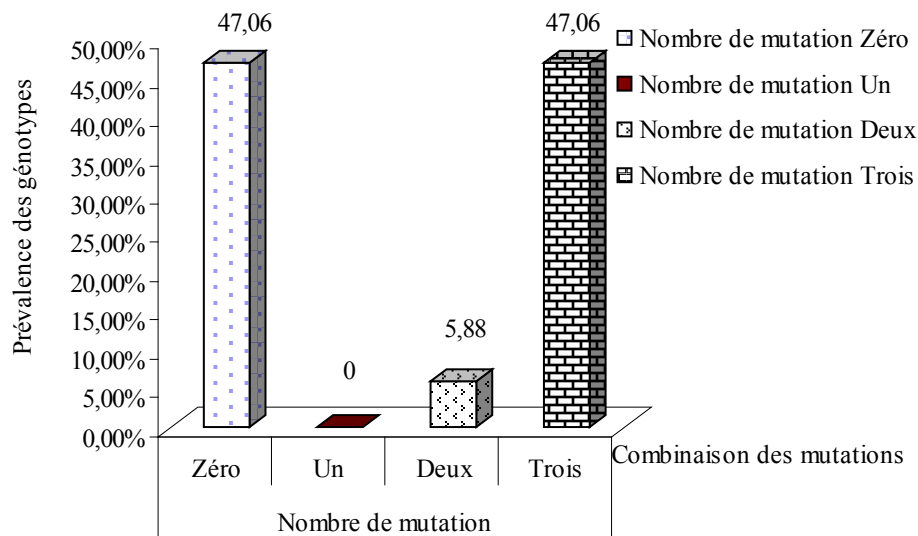


Figure 6 : **Combinaison des mutations par patient**

Nous avons ensuite apprécié les mutations survenant au niveau des codons 51 ; 59 et 108 du dit gène. La figure 6 montre que 47,06 % des 17 échantillons analysés, présentent une triple mutation et 5,88 % présentent une double mutation. Par contre, la simple mutation n'a pas été observée. La double mutation observée ici ne concerne que les codons 108 et 51.

Sur les isolats mutants (52,94%), la mutation de base se trouvant au niveau du codon 108 n'apparaît jamais seule. Elle est toujours accompagnée d'une ou de deux des mutations additives au niveau des codons 51 et 59.

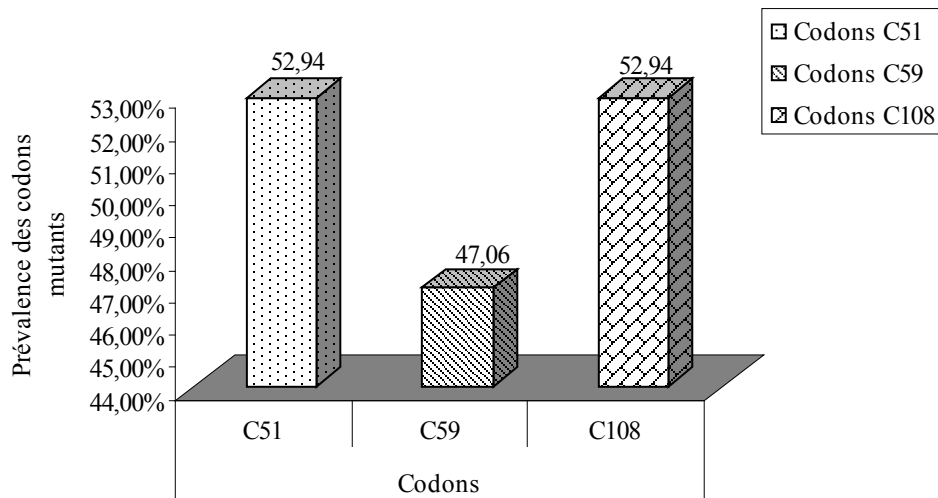


Figure 7 : Comparaison de mutations des codons 108, 51 et 59

Les pourcentages de prévalence des mutants obtenus au niveau des codons ont montré que les codons 108 et 51 présentent la même proportion qui est l'ordre de 52,94%. En d'autres termes, nous avons constaté que les neuf isolats mutants présentent tous une mutation du codon 108 et une mutation du codon 51. Et huit d'entre eux présentent une mutation du codon 59.

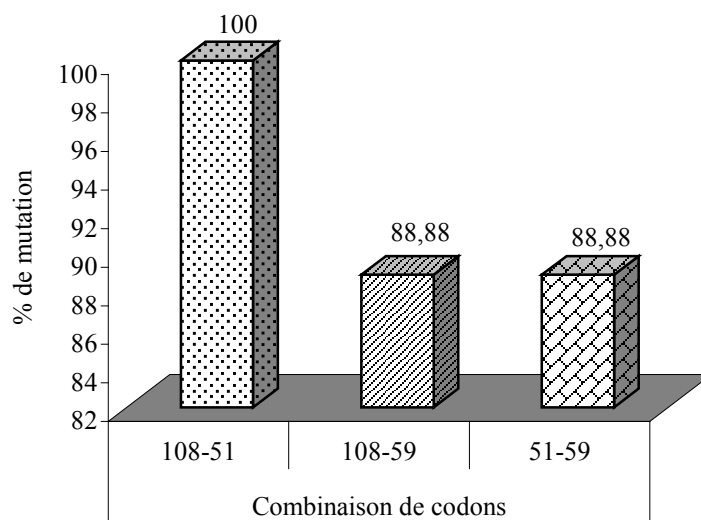


Figure 8 : Comparaison des combinaisons de mutation de deux codons par isolat

Sur les 9 isolats mutants, nous avons cherché les combinaisons de mutations des codons deux à deux et nous avons obtenu : 100 % pour les codons 108 et 51 ; 88,88 % pour les codons 108 et 59 et pour les codons 51 et 59 nous avons 88,88 %.

DISCUSSION

La progénie d'un croisement génétique entre parent sulfadoxine sensible et sulfadoxine résistant a démontré une liaison étroite entre les mutations de la dhfr et la résistance à la SP et une liaison complète entre les mutations multiples de la dhfr et la résistance (Wang *et al.*, 1997).

C'est dans ce contexte que nous avons concentré notre étude sur la prévalence de mutations du gène dhfr de différentes souches de *P. falciparum* dans le département de Pikine en 2003. Notre objectif était d'évaluer la prévalence des mutations au niveau de la dhfr du *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme. La présence de mutations au niveau de ce gène confère une baisse de la sensibilité voire une résistance à la pyriméthamine.

Nous avons recherché des zones de mutations au niveau des codons 108, 51 et 59 du dit gène, de dix sept (17) échantillons prélevés durant la période de Août à Septembre de l'année 2003. L'étude a été effectuée dans le district de Pikine, une banlieue dakaroise connue surtout pour sa très forte densité démographique.

Nous avons utilisé la technique de la RFLP (digestion enzymatique) après avoir effectué une Nested PCR qui permet d'avoir une quantité suffisante d'ADN. Des éventuelles contaminations ont été réduites en utilisant du matériel à usage unique pendant l'extraction et la PCR et en travaillant dans des pièces séparées pour les différentes manipulations (préparation du « mix », amplification de l'ADN, migration électrophorétique et digestion enzymatique).

Cette même technique a été utilisée par plusieurs auteurs qui ont eu des résultats satisfaisants. Parmi eux, on peut citer Cowman *et al.*, 1988, Paterson *et al.*, 1988 et Foote *et al.*, 1990 ; ces auteurs ont fait une analyse génétique par PCR et ont démontré en conséquence le rôle des mutations des gènes dhfr et dhps.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que plus de la moitié des isolats (52,94%), présentent des mutations au niveau du gène dhfr. Les pourcentages de mutation sont de l'ordre de 52,94% ; 52,94 % et 47,06 % respectivement pour les codons 108, 51 et 59. Ainsi sur les isolats mutants obtenus, la mutation de base au niveau du codon 108 est toujours accompagnée par au moins d'une autre. En d'autres termes, nous pouvons dire qu'en plus de la mutation du codon 108, les mutations additives 51 et 59 ont été retrouvées à des pourcentages variables. La triple mutation a été retrouvée à 47,06% tandis que la double mutation à 5,88%.

Nos résultats sont en accord avec la littérature ; au Gabon Aubouy *et al.*, 2003 ont trouvé 63%, 83,3% et 67,8% de mutations respectivement au niveau des codons 108, 51 et 59. Au Sénégal, Ndiaye *et al.*, 2000, avec les mêmes amorces, ont trouvé 71%, 53% et 46% de

mutations respectivement au niveau des codons 108, 51 et 59 sur 36 isolats au niveau du département de Pikine. En 2002, ces mêmes auteurs, ont obtenu 63%, 57% et 46% de mutations respectivement pour les codons 108, 51 et 59. Comparant nos résultats à ceux de Ndiaye, nous avons constaté une diminution des pourcentages de mutations observées de 2000 à 2003 surtout au niveau du codon 108. A partir de l'année 2002, la prise d'antipaludique en monothérapie a été déconseillée. La sulfadoxine-pyriméthamine seule était uniquement recommandé pour la femme enceinte dans le cadre du TPI. Dans le traitement des accès palustres simples, il était préconisé de l'utiliser en association avec un autre antipaludique, de préférence un dérivé de l'artémisinine.

Ces recommandations pourraient expliquer cette baisse de la prévalence de ces mutations entre 2000 et 2003 du fait certainement de la baisse de la pression de sélection.

Cependant les taux que nous avons obtenus demeurent élevés. Cela pourrait être expliqués par la forte pression démographique constatée dans le département de Pikine. En effet, le département de Pikine et celle de Guédiawaye constituent une des zones d'habitation de prédilections des immigrants venant des différentes régions du Sénégal et de la sous région. Cette forte concentration de la population a entraîné une pression foncière avec colonisation d'espaces peu aménagés et soumis régulièrement à des inondations en cas de pluies abondantes. Ainsi le faciès urbain à Dakar et sa banlieue caractérisé par la faiblesse de la prémunition, même chez les adultes et la dégradation des systèmes d'évacuations des eaux de pluies, font que le paludisme ressurgit à tous les âges.

L'automédication constitue également un facteur important dans cette zone. En effet, la plupart des habitants de la banlieue ont tendance à minimiser la maladie avec le temps. Au lieu d'aller dans les postes de santé, ils restent chez eux et utilisent les médicaments comme la Maloxine® à base de SP et souvent à des doses infra thérapeutiques. Il existe également dans cette zone, un marché parallèle importante avec une forte circulation des médicaments sous dosés. Considérant les médicaments vendus en officines trop chers, les populations préfèrent souvent acheter leur traitement au niveau de ces marchés parallèles.

Par ailleurs en, Labbé *et al.*, 2003 ont eux aussi découvert des mutations simples, doubles et triples du gène dhfr dans plusieurs pays d'Afrique. Ces auteurs ont fait leurs études dans certaines localités en Afrique occidentale, Afrique de l'est, Afrique centrale et en Afrique du sud. Et les résultats obtenus pour une simple, double et triple mutation sont respectivement de 8,8%, 36,8% et 29,4% en Afrique occidentale (Nigeria, Mali, Gambie, Ghana, Sierra Leone, Burkina Faso et Guinée), 0%, 47,1% et 35,3% en Afrique de Est (Kenya, Rwanda, Burundi, Uganda et Tanzanie), 0%, 20% et 20% en Afrique centrale (République Centre Afrique,

Congo, Cameroun) et 0%, 66,7% et 0% en Afrique du Sud (Angola et Madagascar). La mutation 108 a été observée uniquement en Afrique de l'ouest alors que dans notre étude, nous n'avons pas observé cette simple mutation.

Labbé *et al.*, 2003 n'ont pas trouvé non plus de triple mutation en Afrique du sud contrairement aux autres régions de l'Afrique où la prévalence de cette triple mutation est relativement importante (plus de 20%). Dans notre étude, nous avons obtenu une prévalence de la triple mutation de l'ordre de 47,06%.

La double mutation (5,88%) notée dans notre étude est très faible comparée à celle retrouvée par Labbé *et al.*, 2003, avec par exemple 66,7% en Afrique du Sud.

Toutes ces études citées ci-dessus montrent que les mutations observées varient en fonction de la position géographique.

De nombreux travaux ont révélés que les mutations du gène *dhfr* semblent être liées à la présence de résistance *in vivo* aux anti-métabolites notamment les anti-foliniques. C'est le cas de la sulfadoxine-pyriméthamine et du cycloguanil.

Parmi ces travaux, nous pouvons citer Allico *et al.* qui en 2002 ont trouvé une forte proportion d'isolats mutants résistants à la sulfadoxine-pyriméthamine en Côte d'Ivoire en observant des mutations du gène *dhfr* au niveau des codons 108, 51 et 59. De même Basco *et al.*, en 1998 ont remarqué qu'au Cameroun les isolats présentant la mutation S108N de *dhfr* seule ou associée à une mutation du codon 59, avaient une réponse clinique adéquate au fansidar et ceux ayant trois mutations de *dhfr* entraînaient un échec thérapeutique précoce ou tardif.

Des études de chimiorésistance *in vivo* faites par Gaye *et al.*, 2002, dans le cadre d'un projet financé par L'USAID pour la réalisation d'activités de recherche durant la période allant de septembre 2001 à octobre 2002 sur la presque totalité du pays ont montré que *P. falciparum* a présenté un début de résistance face à l'association sulfadoxine-pyriméthamine. Les études ont porté sur 8 districts sélectionnés selon la stratification du paludisme : Richard-Toll au nord situé dans le faciès sahélien, Louga, Tourba et Kaolack au centre en zone sahélo soudanienne, Guédiawaye en zone côtière dans la région de Dakar, Vélingara, Kédougou et Ziguinchor situés tous au sud en zone soudano guinéenne dans le faciès tropical. Ces auteurs ont pu observer des taux d'échecs clinique qui varient en fonction de la position géographique et de l'activité économique. Ils ont trouvé des niveaux d'échecs cliniques faibles ; 1,7 % à Kédougou, 5,2 % à Vélingara, 3,3 % à Kaolack, 2,9 % à Richard-Toll, 2 % à Touba et 2 % à Louga. Seul Guédiawaye présente des niveaux d'échecs à 10,7 %. Le taux plus élevé observé au niveau de Guédiawaye pourrait être lié à une pression médicamenteuse plus importante du fait de sa position géographique qui en fait une zone de brassage avec des mouvements

importants de population et une activité économique intense. Guédiawaye étant dans la même situation que Pikine, nous pouvons supposer que les mutations observées au cours de nos travaux pourraient être corrélés à une résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine.

En effet, le taux de résistance in vivo observé à Guédiawaye est 4.5 fois inférieure à la prévalence de la triple que nous avons observé dans la même zone. Devant l'utilisation de la SP dans le cadre du TPI chez la femme enceinte, nous pensons qu'une surveillance de la prévalence des marqueurs de la résistance à la SP s'impose.



CONCLUSION et PERSPECTIVES

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique, l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde. Le Sénégal, où il existe de manière endémique, ne demeure pas en reste avec une forte recrudescence saisonnière. Malgré les multiples politiques de lutttes, le paludisme persiste et représente la première cause de morbidité et de mortalité. Ceci est aggravé par l'apparition et l'extension de la chimiorésistance aux médicaments dans toutes les principales zones d'endémie palustre surtout en Afrique sub-saharienne. Une redéfinition des stratégies thérapeutiques et des perspectives de contrôle de la maladie s'impose. Les antipaludiques constituent la principale défense contre *Plasmodium falciparum* et la chloroquine était un des médicaments les plus utiles jamais développés. Cependant la chimiorésistance de l'agent du paludisme grave s'étend et augmente en Afrique. Et les souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* étaient fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques qui ont contribué à augmenter la mortalité due au paludisme. Ainsi à partir de l'année 2000 en Afrique, la sulfadoxine-pyriméthamine était devenue avec l'Amodiaquine, la seule disponible pour un traitement à coût acceptable de l'accès présumé paludéen dans les pays où la chloroquino-résistance est fréquente. Une surveillance régulière de l'efficacité de ces molécules était indispensable surtout avec l'avènement des combinaisons d'antipaludiques. La biologie moléculaire en particulier la PCR constitue un nouvel outil à côté des méthodes classiques (tests in vitro et in vivo) pour étudier cette efficacité.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude que nous avons menée dans le district sanitaire Saint Dominique de Pikine pendant la saison des pluies 2003, dont le objectif est d'évaluer la prévalence de mutations du gène dhfr du *P. falciparum* responsable de la résistance à la pyriméthamine.

L'étude a porté sur 17 patients présentant un accès palustre simple tous porteurs du *P. falciparum*.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- 52,94% des souches analysées portent au moins une mutation sur le gène dhfr.
- Sur 17 échantillons analysés, 8 soit 47,06 % des souches portent une triple mutation dhfr, la double mutation n'a été retrouvée que dans 5,88 % des souches analysées. Par contre la simple mutation n'a pas été observée.

Beaucoup de travaux ont démontré une liaison étroite entre les mutations de la dhfr et la résistance de *plasmodium falciparum* à la SP et une liaison complète entre les mutations multiples de la dhfr et cette résistance. Il semble cependant que d'autres facteurs interviennent notamment l'état immunitaire de la personne car la prévalence de la triple mutation qui

semble fortement corrélér à la résistance ne reflète pas la réalité obtenue lors des études in vivo.

Ces études moléculaires constituent un bon signal d'alarme pour alerter les décideurs politiques quant aux choix de politiques de prévention ou de traitement du paludisme

Il serait intéressant aussi de généraliser cette étude sur tout le territoire national pour mieux connaître l'étendu de la prévalence par zone des mutations du gène dhfr et la sensibilité in vivo des souches de *P. falciparum* à la SP qui est actuellement le médicament préconisé dans le TPI chez la femme enceinte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allico J. D., Basco L. K. et Mazabraud A.** Mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à Yopougoun (Abidjan) : étude in vivo de la sensibilité à la chloroquine et évaluation de la résistance à la pyriméthamine après analyse de mutation ponctuelle du gène de dihydrofolate réductase. *Cahier santé*, **2002** ; **12** : 363-7.
- Aubouy A., Jafari S., Huart V., Migot-Nabias F., Mayombo J., Durand R., Bakary M., Le Bras J. et Deleron P.** Dhfr and dhps genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2003** ; **52** : 43-49.
- Babiker H. A., Creasey A. M., Fenton B., Bayoumi R. A. L., Arnot D. E. et Walliker D.** Genetic diversity of *Plasmodium Falciparum* in a village eastern Sudan. 1. Diversity of enzyme 2D-PAGE proteins and antigens. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene*, **1991** ; **85** : 572-577.
- Bâ-Fall Fatou.** Le paludisme en zone mésoendémique: relation entre la transmission, l'infection et la morbidité palustre à Ndiop (Sénégal). *Thèse de troisième cycle de Biologie animale* **2000**. Ex. 51 : 10-14
- Basco L. K., Eldin De Pecoulas P., Wilson C., Lebras J. et Mazabraud A.** Point mutation in the dihydrofolate reductase gene as the molecular basis for pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **1995** ; **69** : 135-138.
- Basco L. K., Tahar R. et Ringwald P.** Molecular basis of in vivo resistance of sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites *Antimicrob Agents chemother*, **1998** ; **42**, 1811-1814.
- Bogard M. et Lamoril J.** Biologie moléculaire en biologie clinique : *I. Méthodes*. Elsevier, **1998** ; 348p.

- Bray P. G. & Ward S. A.** A comparison of the phenomenology and genetics multidrugresistance in cancercells and quinolineresistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, **1998** ; **77** : 1-28.
- Bray P. G., Mungthin M., Ridley R. G. Et Ward S. A.** Access to hematin : the basis of chloroquine resistance. *Molec. Pharmacol.* **1998** ; **54** : 170-179.
- Carlton J., Mackinnon M. et Walliker D.,.** A chloroquine resistance locus in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol.* **1998** ; **93** : 57-72.
- Cowman A. f., Morsy M. J., Biggs B. A., Cross G. A., Foote S. J.** Amino-acid changes linke to pyrimethamine resistance in the dhfr-T. S gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988** ; **85**: 9109-9113.
- Darnel J., H. et Baltimore D.** Synthèse, réparation et recombinaison de L'ADN In : « La cellule Biologie Moléculaire ». *Edition VIGOT*, Paris. **1988** : 517-565.
- Delpech M., Bienvenu T., Meunier C., Bousquet S., Chiron S., Richard L., Gautheret-Dejean A., Rouselle J. F. et Feldmann D.** Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annale de Biologie Clinique.* **1999** ; **57** : 77-84.
- Diagne N., Fontenille D., Konaté L., Faye O., Lamizana M. T., Legros F., Molez J. F. et Trape J. F.** Les Anophèles du Sénégal : liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path.* **1994** ; Ex. **87** : 267-277
- Diallo S., Ndir O., Faye O., Diop B. M., Dieng Y., Bah I. B., Dieng T., Gaye O., Konaté L. et Faye O.** Le paludisme dans le district sanitaire de Dakar (Sénégal). Parasitémie et accès paludéens. *Bull. Soc. Path.* **1998** ; Ex. **91** : 208-213.
- Djigo Souleymane.** Evaluation de l'efficacité de la chloroquine et de sulfadoxine pyriméthamine dans le traitement du paludisme. *Thèse pharmacie Dakar.* **2002** ; Ex. **23** : 6-7

Durand R., Gabbett E., Di Piazza J. P., Delabre F. et Le Bras J. Analysis of kappa and omega repeats of cg2 gene and chloroquine susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharian Africa. *Molec. Biochem Parasitol.* **1999**; **101** :185-197.

Elie C. Les approches expérimentales In « La PCR : un procédé de répliation in vitro ». *Editions Médicales Internationales*, Paris, **1993** : 45-67.

Faye O., Fontenille D., Hervé J. P., Diack P. A., et Mouchet J. Le paludisme en zone sahaliennne du Sénégal. 1. Données entomologiques sur la transmission. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1993** ; **73** :21-30

Faye Yankhoba. Paludisme chloroquino-résistant : intérêt du dosage de la chloroquine dans les urines. *Thèse pharmacie Dakar.* **1994** ; 88 pages.

Fontenille D., Lochouarn Diatta M., Sokhna C., Dia I., Diagne N., Lemasson J. J., Bâ K., Tall A., Rogier C. et Trape J. F. Four years entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1997a** ; **91**: 647-652.

Fontenille D., Lochouarn, Diagne N., Sokhna C., Lemasson J. J., Diatta M., Konaté L., Faye, O., Rogier C. et Trape J. F. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997b** ; **56** : 247-253.

Foote S. J., Galatis D., Cowman A. F. Amino-acid in the dhfr-TS gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil- resistance differ from those involved in pyrimethamine-resistance. *Nature* **1990** ; 345:255–8.

Gaye O et collaborateurs. Surveillance de la chimiorésistance du paludisme au Sénégal. *Rapport final* **2002** ; 43p.

- Hamza A., Babiker H. A., Satti G. et Walliker D.** Genetic changes in the population of *Plasmodium falciparum* in a Sudanese village over a three year period. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **1995** ; **53**: 7-15
- Innis M. A. et Gelfand D. H.** Optimization of PCR In : « PCR Protocols : A Guide to Methods and Applidations ». *Academic Press Inc*, **1990** : 3-12
- Jackson D. P., Hayden J. D. et Quirke P.** Extraction of nucleic acid from fresh or archival materiel in PCR. *A Pratical Approach*. IRLPRESS, *Oxford*. **1993** : 29-50
- Ju L. Y. et Charron D.** Typage HLA de classe II par amplification d'ADN et digestion avec des endonucléases spécifiques d'allèles In : Amplification enzymatique des séquences nucléotidiques par PCR. *Editions INSERM*. Paris. **1992** : 31-42
- Kaplan J. C . et Delpech M .** Biologie Moléculaire et Médecine (2è édition). FLAMMARION. **1993** : 755p.
- Kemp D. J., Cowman A. F., et Walliker D.** Gebnetic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Adv Parasitology*. **1990** ; **29** : 75-147.
- Kocher T. D. Et Wilson A. C.** DNA Amplification by the polymarse chain reaction In : “Essential Molecular Biology” : *A Practical Approach*. IRLPRESS, OXFORD. **1993** ; **2** : 185-208.
- Labbé A. C., Patel S., Crandall I. et Kain K.C.** A molecular surveillance system for global pattemns of drugs resistance in imported malaria. *Emerg Infect Dis*. Toronto General Hospital, University of Toronto, Canada . **2003** ; Vol. 9, No.1
- Le Bras J., Durand R., Di Piazza J. P., Pradines B., Longuet C. et Parzy D.** Prise en compte des disparités de r é sistance de P.falciparum en Afrique dans la décision chimioprophilactique, *Presse Med*. **1998** ; **27** : 1419-1423
- Mc Bride J. S., Walliker D. et Morgan J.** Antigenic diversity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. **1982** ; **217** : 254-257.

- Meunier J. R. et Grimond P. A. D.** Factors affecting the reproducibility of a random amplified DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*. **1993** ; **144** : 373-379.
- Mullis K.** L'intervention insolite de l'amplification des gènes. *Pour la science*. **1990** ; **152** : 44-53.
- Ndiaye D., Daily J. P., Sarr O., Ndir O., Gaye O., Mboup S. et Wirth D. F.** Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop. Med. and Inter. Health*. **2005** ; **11** : 1176-1179.
- Niang M.** Analyse comparative du polymorphisme génétique de *Plasmodium falciparum* recueillies simultanément dans le sang veineux et le placenta de femmes accouchant à la maternité de Guédiawaye. *DEA Biologie Animale*. FST UCAD Dakar. **2001** ; Ex. 152 : 70p.
- Nzila-Mouda A., Mberu E. K., Sibley C. H., Plowe C. V., Winstanley P. A. et Watkins W. M.** Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates : correlation between pyrimethamine and chlorocycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob agents Chemother*. **1998** ; **42** : 164-169.
- Paskewitz S. M. et Collins F. H.** Use of the polymerase chain reaction to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomolog*. **1990** ; **4** : 367-373.
- Paskewitz S. M., Kakin N. G., Coetzee M. Et Hunt R. H.** Evaluation of the polymerase chain reaction for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) complex in Southern Africa. *Journal of Medical Entomology*. **1993** ; **30** (5) : 953-957.
- Peterson D. S., Walliker D., Wellems T. E.** Evidence that a point mutation in DHFR-Thymidylate synthetase confers resistance of pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem*. **1988** ; 49(21) : 6166-9.

- Ridley R. G.** Malaria : dissecting chloroquine resistance. *Current Biology*. **1998** ; **8** : R346-R349.
- Scott J. A., Brogdon W. G. Et Collins F. H.** Identification of a single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medecine and Hygiene*. **1993** ; **49 (4)** : 520-529.
- Seck P. A.** Etude la tolérance et de l'efficacité de la quinine diluée, administrée par voie intra rectale dans le traitement du paludisme non compliqué de l'enfant en milieu rural sénégalais. *Thèse Med. Dakar*. Ex. **2003** ; **25**: 8p.
- Sirawarapon W, S athitkul S. Sirawarapon R. Yuthavong Y. Santi B. V.** Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc. Nat. Acad. Sc USA*. **1997**; **94** : 1124-1129.
- Su X. Z., Kirkman L. A., Fujioka H. et Wellems T. E.** Complex polymorphism's in a 330-kDa protein are linked to Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*. **1997** ; **91** : 593-603.
- Taylor G. R.** Polymerase chain reaction : basic principles and automation In «PCR » : A *Pratical Approach*. IRLPRESS, OXFORD. **1993** : 1-14.
- Trape J. F., Legros F., Ndiaye P., Konaté L., Bah I. B., Diallo S., Verdier F., Hatin I. et Le Bras J.** Chloroquine- resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **1989** ; **83** : 761.
- Trape J. F., Pison G., Presiozi M. P., Enel C., Desgrées du Lou, Delaunay V., Samb B., Lagarde E., Molez J. F. et Simondon F.** Impact of resistance on malaria mortality. *C. R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie (Life Science)*. **1998** ; **321** : 689-697.
- Triglia T. et Cowman A. F.** The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug resist update*. **1999** ; **2** : 15-19.

Wang P., Read M., Sims P. F. Et Hyde J.E. Sulfadoxine resistance in the human parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation. *Molec. Microbiol.* **1997**; **23** : 979-986.

Titre : Etude de l'évolution de la prévalence d'un marqueur génétique (dhfr) de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine dans le district de Pikine.

Nom du candidat : **M^{lle} Aminata Collé LO**

Nature du mémoire : DEA de Biologie Animale

Jury : Président	M. Ngor	FAYE	Professeur
Membres	M. Omar	GAYE	Professeur
	M. Malick	FALL	Maître de Conférence
	M. Mbacké	SEMBENE	Maître de Conférence

Soutenu le 11 novembre à 10 heures à l'amphithéâtre 6 de la F.S.T.

Résumé :

Après plusieurs décennies de recherches et de lutte, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique dans le monde. Au Sénégal, il est la première cause de morbidité et de mortalité constituant le premier motif de consultation au niveau des centres de santé.

Face à l'urgence que constitue la lutte contre cette affection un programme national a été élaboré avec comme principales stratégies : la prise en charge correcte dans le cas du paludisme, la surveillance régulière de la morbidité palustre et la surveillance de la sensibilité des plasmodiums aux antipaludiques.

Après la découverte de la chloroquino-résistance à travers des études faites par plusieurs auteurs sur la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, l'OMS a pris l'initiative de remplacer ce médicament de premier intention par un autre : l'association sulfadoxine-pyriméthamine. C'est dans ce cadre que nous avons mené une étude sur différents patients hébergeant le parasite, recueillis de Août à septembre de l'année 2003 dans le district de Pikine, zone d'endémicité palustre élevée.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la prévalence de mutation au niveau d'un marqueur génétique : le dihydrofolate réductase (dhfr) de *P. falciparum*. Des mutations sur le gène dhfr altèrent la structure de la protéine et diminuent son affinité pour la pyriméthamine et le cycloguanil conduisant à une résistance aux inhibiteurs de ce gène.

Après extraction, amplification, PCR (Nested PCR) suivie d'une digestion enzymatique nos résultats ont montré que sur 17 isolats analysés, 9 (52,94 %) ont présenté au moins une mutation au niveau du gène. Ensuite nous avons cherché des mutations au niveau de trois codons : 108, 51 et 59. Et nous avons constaté que sur les 9 isolats mutants, 8 (88,88 %) ont présenté une triple mutations, 1 soit 11 % présenté une double mutation et la simple mutation n'a pas été retrouvée.

Les résultats que nous avons obtenus confirment bien d'autres études in vivo et in vitro sur la chimiorésistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine au Sénégal et en Afrique. Raison pour laquelle depuis quelques temps de nouveaux médicaments comme les ACT sont mis sur le marché en remplacement à la sulfadoxine-pyriméthamine. La découverte d'un vaccin efficace pourrait s'avérer être le meilleur moyen de lutte et de protection contre le paludisme. Plusieurs types de vaccins ont été élaborés ou sont en cours, mais aucun n'a encore donné entière satisfaction. Cependant les importants progrès réalisés permettent d'espérer issue favorable à cette situation.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine-pyriméthamine, mutation, dihydrofolate réductase (dhfr), PCR, digestion enzymatique.