

Sommaire

Sigles et abréviations	v
Liste de tableaux	vii
Liste des figures	vii
Liste des annexes	vii
Résumé.....	viii
Abstract.....	ix
Introduction.....	2
Enoncé du problème	3
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	4
1. Définition	5
2. Epidémiologie de l'agent pathogène.....	5
2.1. Taxinomie de l'agent pathogène	5
2.2. Ultrastructure et matériel génétique de <i>P. falciparum</i>	5
2.3. Transmission du paludisme.....	6
2.4. Cycle évolutif du plasmodium	7
2.5. Répartition géographique	10
3. Résistance innée et immunité de l'hôte.....	11
3.1. Résistance innée	11
3.2. Prémunition.....	11
4. Formes cliniques	12
4.1. Paludisme simple	12
4.2. Paludisme grave	12
4.3. Autres formes cliniques	12
5. Diagnostic biologique du paludisme.....	13
5.1. Diagnostic biologique non spécifique.....	13
5.2. Diagnostic parasitologique.....	13
5.3. Diagnostic immunologique spécifique.....	14
5.4. Diagnostic moléculaire	15
6. Lutte contre le paludisme	15

6.1. Prise en charge des cas de paludisme	15
6.2. Prévention du paludisme.....	16
7. Association paludisme et grossesse	18
7.1. Immunité antipalustre pendant la grossesse.....	18
7.2. Infestation placentaire	19
7.3. Influence réciproque entre paludisme et grossesse	19
7.4. Lutte contre le paludisme pendant la grossesse	20
8. Résistance de plasmodium aux antipaludiques.....	21
8.1. Définition	21
8.2. Mécanisme de la chimiorésistance.....	21
8.3. Mécanisme de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine	22
8.4. Facteurs favorisant la propagation de la chimiorésistance.....	23
8.5. Méthodes d'étude de la chimiorésistance	24
9. Revue de la littérature sur la résistance de <i>P. falciparum</i> à la SP pendant la grossesse	25
9.1. Résistance à la SP chez les femmes enceintes au Burkina Faso.....	25
9.2. Mutations conférant la résistance à la SP chez les femmes enceintes en Afrique	25
DEUXIEME PARTIE : NOTRE TRAVAIL	27
1. Question de recherche	28
2. Hypothèse de recherche	28
3. Objectifs	28
3.1. Objectif général.....	28
3.2. Objectifs spécifiques	28
4. Méthodologie	28
4.1. Sites de collecte des échantillons de l'étude	28
4.2. Type et période d'étude.....	29
4.3. Population d'étude	29
4.4. Taille d'échantillon	30
4.5. Echantillonnage.....	30
4.6. Variables étudiées	30
4.7. Collecte des données	30

4.8. Définitions opérationnelles	36
4.9. Analyse des données	36
4.10. Considérations Ethiques.....	37
5. Résultats	38
5.1. Caractéristiques générales de la population de l'étude	38
5.2. Prévalence des mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	40
5.3. Facteurs associés aux triples et quadruples mutations	40
6. Discussion	44
6.1. Contraintes et limites de l'étude	44
6.2. Prévalence des mutations <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i>	44
6.3. Facteurs associés à la fréquence des mutations	46
Conclusion	44
Références.....	46
ANNEXES.....	53

Sigles et abréviations

ADN :	Acide DesoxyriboNucléique
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
CNRST	Centre National pour la Recherche Scientifique de Technologique
CPN	Consultation prénatale
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à Base d'Artémisinine
CQ :	Chloroquine
CSA :	Chondroïtine Sulfate A
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CRP	C Reactive Protein
CSPS :	Centre de Santé et Promotion Sociale
°C	Degré Celcius
DBS	Dried Blood Spots
dl :	Décilitre
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
FM :	Frottis mince
g :	gramme
GE :	Goutte épaisse
HRP2 :	Histidine Rich Protein 2
IFI :	ImunoFluorescence Indirecte
IgG	Immunoglobuline G
IRSS	Institut de Recherche en Sciences de la Santé
mg	Milligramme
µL :	Microlitre
µM :	Micromolaire
µm	Micromètre
 mM	Millimolaire
MILDA :	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'Action
Min	Minute
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odd Ratio
<i>P. falciparum</i> :	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i> :	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i> :	<i>Plasmodium malariae</i>

P. ovale :	<i>Plasmodium ovale</i>
P. vivax :	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PfEMP1 :	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
PLDH :	Lactate Déshydrogénase parasitaire
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC :	Quantitative Buffy-Coat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Seconde
SA :	Semaine d'Aménorrhée
SP :	Sulfadoxine-Pyriméthamine
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPIg-SP :	Traitemen Préventif Intermittent à la Sulfadoxine Pyriméthamine au cours de la grossesse
WHO	World Health Organisation
%	Pourcentage

Liste de tableaux

Tableau I: Réactifs et conditions de la PCR pour le gène Pfdhfr.....	34
Tableau II : Réactifs et conditions de la PCR pour le gène Pfdhps	35
Tableau III: Caractéristiques générales de la population d'étude	39
Tableau IV : Répartition de la proportion des différentes mutations	40
Tableau V : Facteurs associés à la triple mutation	41
Tableau VI : Facteurs associés à la quadruple mutation	42
Tableau VII: Relation entre présence des mutations, densité parasitaire et taux d'hémoglobine	43
Tableau VIII: Relation entre la présence des mutations et l'anémie.....	43

Liste des figures

Figure 1 : Ultrastructure schématique du mérozoïte de <i>P. falciparum</i>	6
Figure 2: Cycle évolutif de <i>Plasmodium</i>	9
Figure 3 : Biosynthèse des folates et sites d'action de la Sulfadoxine-Pyriméthamine.....	23
Figure 4 : Principe de l'extraction de l'ADN	32

Liste des annexes

Annexe 1 : Critères de gravité du paludisme	54
Annexe 2 : Classification pharmaco-thérapeutique sommaire des antipaludiques	55
Annexe 3 : Protocole de l'extraction de l'ADN	56
Annexe 4 : Protocole de la PCR et de la Digestion Enzymatique.....	59

Résumé

Introduction

La résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine utilisée en traitement préventif intermittent au cours de la grossesse (TPIg-SP) prend de l'ampleur en Afrique de l'Ouest. Cependant, au Burkina Faso, il existe très peu de données sur les marqueurs moléculaires de résistance à la SP chez les femmes enceintes. L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* chez les femmes enceintes de la ville de Bobo-Dioulasso, cinq ans après l'implémentation du TPIg-SP.

Méthodologie

Nous avons collecté entre septembre et décembre 2010, lors des consultations prénatales, des confettis de sang séché auprès de 105 femmes enceintes ayant une infestation à *P. falciparum* confirmée à la microscopie. Les confettis ont été analysés grâce à la PCR nichée pour la détection des mutations aux codons 51, 59, 108 et 164 pour le gène *Pfdhfr* et aux codons 437 et 540 pour le gène *Pfdhps*.

Résultats

Les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* ont été analysés avec succès à la PCR dans 92,4% (97/105) des échantillons. Au total 97,9% (95/97) des échantillons analysés contenaient au moins une mutation du gène *Pfdhfr*. La prévalence de la mutation *Pfdhps* 437G était de 79,4%. Les proportions de la triple mutation *Pfdhfr* (Ile51+Arg59+Asn108) et de la quadruple mutation (triple mutation *Pfdhfr* + mutation *Pfdhps* A437G) étaient respectivement de 24,7% et de 19,6%. Nous n'avons pas enregistré de mutations *Pfdhfr* 164L et *Pfdhps* 540E. Les prévalences de la triple et de la quadruple mutation étaient plus élevées chez les femmes ayant bénéficié du TPIg-SP ($p > 0,05$).

Conclusion

Nos résultats suggèrent la nécessité d'une surveillance continue de la résistance à la SP et d'une évaluation de l'efficacité *in vivo* de la SP chez les femmes enceintes au Burkina Faso.

Mots clés : Paludisme, Grossesse, Sulfadoxine-pyriméthamine, Résistance, Burkina Faso.

Abstract

Title: Profile of *Pfdhfr* and *Pfdhps* gene mutations in pregnant women in Bobo-Dioulasso, five years after the adoption of the Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine

Introduction

P. falciparum resistance to sulfadoxine-pyrimethamine used as intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp-SP) is increasing in West Africa. However data concerning molecular markers of resistance to SP in pregnancy are scarce in Burkina Faso. The aim of this study was to determine the prevalence of *Pfdhfr* and *Pfdhps* mutations in pregnant women of Bobo-Dioulasso, five years after the IPTp-SP implementation in Burkina Faso.

Methods

From September to December 2010, we collected dried blood spots (DBS) during antenatal care visits from 105 pregnant women with microscopically confirmed falciparum malaria infection. DBS were analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the alleles 51, 59, 108, 164 in the *Pfdhfr* gene and 437, 540 in the *Pfdhps* gene.

Results

Both *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes were successfully genotyped in 92.4% (97/105) of the samples. Overall, 97.9% (95/97) of the samples carried at least one mutation at *Pfdhfr* gene. The prevalence of *Pfdhps* 437G mutation was 79.4%. The proportions of *Pfdhfr* triple mutation (Ile51+Arg59+Asn108) and quadruple mutation (triple *Pfdhfr* mutation + *Pfdhps* A437G mutation) were 24.7% (24/97) and 19.6% (19/97), respectively. None of the samples had the *Pfdhfr* I164L and the *Pfdhps* K540E mutations. The prevalence of the triple and quadruple mutation was higher among pregnant women who took the IPTp-SP ($p > 0.05$).

Conclusion

There is a need for continuous monitoring of SP resistance and to assess the *in vivo* efficacy SP in pregnant women in Burkina Faso.

Keywords: Malaria, pregnancy, sulfadoxine-pyrimethamine, resistance, Burkina Faso.

INTRODUCTION

Introduction

Le paludisme ou malaria est une parasitose hémolysante fébrile et potentiellement mortelle due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'Homme lors de la piqûre infestante de la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*. Malgré les efforts de lutte contre la maladie, le paludisme demeure un problème de santé publique. Selon l'OMS, 214 millions de cas de paludisme sont survenus en 2015 à travers le monde dont 88% en Afrique Sub-Saharienne (1). Dans le monde, le nombre de décès a été estimé à 438 000 cas en 2015 dont 90% en Afrique au Sud du Sahara (1). Au Burkina Faso, le paludisme est la première cause de consultation d'hospitalisation et de décès dans les formations sanitaires (2). Les enfants de moins de cinq ans sont les plus touchés par cette maladie tropicale et parmi les adultes, les femmes enceintes sont les plus concernées (3,4). La prévention du paludisme chez la femme enceinte est axée sur le traitement préventif intermittent (TPI) à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP). En effet, l'administration de doses de SP séparées d'au moins un mois pendant la grossesse permet de réduire la morbidité et la mortalité pendant la grossesse (5). Cependant, l'efficacité de la SP pendant la grossesse est menacée par la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*, l'espèce la plus pathogène et prédominante en Afrique et en particulier au Burkina Faso (1). Dans la plupart des cas, la résistance est secondaire à une modification au niveau de l'ADN du parasite. Des mutations des gènes de *P. falciparum* codant pour la synthèse de la dihydrofolate réductase (*pfdhfr*) et de la dihydroptéroate synthase (*pfdhps*) ont été identifiées comme étant associées à la résistance à la SP (6,7). Sur le gène *pfdhfr* des mutations au niveau des codons 50, 51, 59, 108 et 164 agissent en synergie pour augmenter la résistance à la pyriméthamine (8). De même, des mutations au niveau des codons 436, 437, 540, 581 et 613 du gène *pfdhps* agissent en synergie pour augmenter le niveau de résistance à la sulfadoxine (8). Les mutations haplotypiques les plus décrites comme étant associées à des résistances à la SP sont la triple mutation (*pfdhfr* 51, 59 et 108), la quadruple mutation (*pfdhfr* 51, 59 et 108 et *pfdhps* 437) et la quintuple mutation (*pfdhfr* 51, 59 et 108 et *pfdhps* 437 et 540) (9,10). Dans cette étude, il s'agira d'étudier le profil des mutations de ces deux gènes chez les femmes enceintes, à Bobo-Dioulasso, cinq ans après l'adoption du TPI à la SP au Burkina Faso.

Enoncé du problème

Dans les pays à forte transmission du paludisme comme le Burkina Faso, la SP est utilisée dans le cadre du TPI et de la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) respectivement chez la femme enceinte et chez les enfants de moins de cinq ans. Ce contexte de chimioprévention de masse augmente la pression médicamenteuse qui pourrait favoriser la propagation de la résistance de *P. falciparum* à la SP (11–14).

En Afrique de l’Ouest, la prévalence de la résistance de *P. falciparum* à la SP chez les femmes enceintes va crescendo et varie de 5 à 85% (10,15,16). Cependant, il existe très peu de données sur la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la SP chez les femmes enceintes au Burkina Faso (5,17). En effet, cinq ans après l’adoption du TPIg-SP, au cours d’une étude d’efficacité de la SP pendant la grossesse, il a été rapporté des fréquences de 7,1% et de 44,9% respectivement pour la double mutation du gène *Pfdhfr* et de la triple mutation du gène *Pfdhfr* chez des femmes enceintes dans le district sanitaire de Ziniaré (5). En outre, au cours de la même période une étude menée à Nanoro chez des femmes enceintes avait noté des proportions de 35,7% et de 11,4%, respectivement pour la double mutation du gène *Pfdhfr* et la triple mutation (17).

Nous nous proposons d’étudier le profil des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* chez les femmes enceintes à Bobo-Dioulasso cinq ans après l’adoption de la stratégie du TPIg-SP au Burkina Faso.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

1. Définition

Le mot paludisme ou malaria dérive du latin palus (marais) ou mal aria (mauvais air). Il s'agit d'une érythrocytopathie parasitaire due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui dans la quasi-totalité des cas, est transmis à l'Homme lors de la piqûre de la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*.

On distingue le paludisme-infestation ou paludisme asymptomatique correspondant à la présence du parasite sans signes cliniques et le paludisme-maladie correspondant à la présence du parasite associée à des signes cliniques dominés par la fièvre.

2. Epidémiologie de l'agent pathogène

2.1. Taxinomie de l'agent pathogène

Les parasites responsables du paludisme chez l'Homme sont classés comme suit :

- ❖ **Phylum:** *Apicomplexa*
- ❖ **Classe :** *Sporozoea*
- ❖ **Ordre :** *Haemosporida*
- ❖ **Famille :** *Plasmodiidæ*
- ❖ **Genre :** *Plasmodium*
- ❖ **Sous-genre :** *Plasmodium laverania* (pour l'espèce *P. falciparum*) (18)
- ❖ **Espèces :**
 - ❖ Du sous-genre *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*;
 - ❖ Du sous-genre *Laverania*: *P. falciparum*

2.2. Ultrastructure et matériel génétique de *P. falciparum*

Les plasmodiums sont des organismes unicellulaires. Il s'agit d'une cellule dont la membrane cytoplasmique a des tailles et des formes différentes selon le stade évolutif du parasite. Comme les autres eucaryotes, le matériel génétique est entouré d'une membrane nucléaire (figure1).

Ce matériel génétique est organisé en 14 chromosomes (19). L'ADN de *P. falciparum* a été complètement séquencé en 2004 (20). Il est composé de $23,3 \times 10^3$ paires de bases avec un pourcentage de GC de 19,4% (20). Le génome est composé de 5403 gènes (20). Le gène

Pfdhfr est situé sur le chromosome 4 tandis que le gène *Pfdhps* est situé sur le chromosome 8 (21).

Ces deux gènes, *Pfdhfr* et *Pfdhps*, codent respectivement pour la synthèse de la dihydrofolate reductase et de dihydropteroate synthase. Ces enzymes interviennent dans le métabolisme de l'acide folique qui est impliqué dans la production d'énergie du parasite.

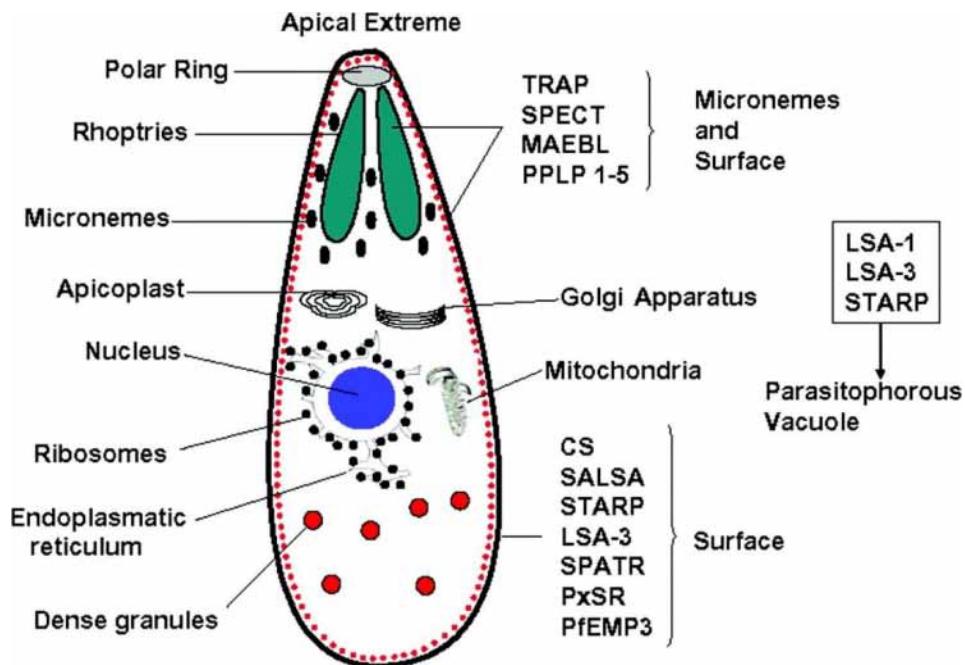


Figure 1 : Ultrastructure schématique du merozoïte de *P. falciparum* (22).

2.3. Transmission du paludisme

- ❖ **Voies de transmission**
- ❖ La transmission vectorielle est la plus fréquente et provoquée par la piqûre de l'anophèle femelle au cours de son repas de sang ;
- ❖ La transmission passive est rare et peut se faire par voie transfusionnelle, transplacentaire ou de façon exceptionnelle par les objets tranchants souillés.

❖ Vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme sont des arthropodes appartenant à la classe des insectes, à l'ordre des diptères, au sous-ordre des nématocères, à la grande famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*.

En Afrique sub-saharienne, les deux principales espèces vectrices sont : le complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Au Burkina Faso, les études entomologiques révèlent que les principaux vecteurs du paludisme sont : *Anophèles gambiae s.l.*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus* (23,24).

2.4. Cycle évolutif du plasmodium

Le cycle biologique du parasite est indirect car se déroulant chez 2 hôtes dont l'Homme comme hôte intermédiaire et l'anophèle femelle comme hôte définitif et vecteur.

❖ Cycle du plasmodium chez l'Homme

La multiplication chez l'Homme est asexuée ou schizogonique et se déroule schématiquement en deux étapes : une étape hépatique ou exo-érythrocytaire et une étape sanguine ou intra-érythrocytaire (figure 2).

✓ Le cycle intra-hépatique

Lors de son repas sanguin chez l'Homme, l'anophèle femelle injecte, en même temps que sa salive, des formes plasmodiales appelées sporozoïtes. En 40 minutes, ces sporozoïtes atteignent le foie où ils colonisent les hépatocytes et deviennent des trophozoïtes. Les trophozoïtes vont se multiplier par schizogonie pour donner des schizontes. Les schizontes mûrs appelés corps bleus renferment 10 000 à 30 000 merozoïtes. Les merozoïtes sont libérés dans le sang après éclatement des hépatocytes. Le cycle hépatique dure 5,5 jours chez *P. falciparum*, 8 à 9 jours pour *P. ovale* et *P. vivax* et 15 jours chez *P. malariae*. Certains sporozoïtes particuliers de *P. vivax* et de *P. ovale*, après inoculation restent quiescents pendant des périodes allant de 1 à 13 mois selon l'espèce plasmodiale. On les appelle les hypnozoïtes. Ils reprennent leur développement pour donner des trophozoïtes, des schizontes, et des merozoïtes.

✓ Le cycle intra-érythrocytaire

Après éclatement des schizontes hépatiques, les merozoïtes libérés arrivent dans le sang et pénètrent dans les érythrocytes. Au bout de quelques minutes, ils prennent une forme en anneau de 1 à 2 μm appelés trophozoïtes sanguins. Ces trophozoïtes se nourrissent de l'hémoglobine érythrocytaire et produisent des pigments appelés hémozoïne. Les noyaux des trophozoïtes se multiplient pour donner des schizontes sanguins. Les schizontes mûrs ont entre 8 et 32 merozoïtes selon l'espèce plasmodiale et constituent des rosaces. La durée de maturation du trophozoïte sanguin est de 24 heures pour *P. knowlesi* (25), 48 heures pour *P. falciparum* et les autres espèces responsables de fièvre tierce ; elle est de 72 heures pour *P. malariae* responsable de la fièvre quarte. Après éclatement des rosaces, les merozoïtes pénètrent dans de nouveaux globules rouges et recommencent un nouveau cycle érythrocytaire. Cependant, après un certain nombre de cycles érythrocytaires, il apparaît des formes sexuées qui sont les gamétocytes, uninucléés. On distingue le gamétocyte mâle ou micro-gamétocyte et le gamétocyte femelle ou macro-gamétocyte.

❖ Cycle du plasmodium chez le moustique

Il associe la gamogonie (cycle sexué) et la sporogonie. Lors de son repas sanguin par piqûre d'un Homme contaminé, l'anophèle femelle absorbe les formes parasitaires du plasmodium. Seuls les gamétocytes gagnent l'intestin moyen de l'insecte. Le macro-gamétocyte subit une division chromatinienne et se transforme en gamète haploïde. Quant au micro-gamétocyte, il subit plusieurs divisions pour donner 8 noyaux fils, puis par le phénomène d'exflagellation libère 8 gamètes mâles haploïdes mobiles. La fécondation entre un gamète femelle et un gamète mâle donne un œuf mobile appelé ookinète. Ce dernier quitte rapidement la paroi de l'estomac du moustique, traverse la membrane péritriphique, passe entre les cellules de la paroi stomacale et se retrouve à la face externe sous la membrane séreuse. Il se transforme en oocyste dont le noyau subit plusieurs divisions pour aboutir à plus de 10 000 éléments fils: ce sont les sporozoïtes. Les sporozoïtes libérés, après éclatement de l'oocyste, gagnent les glandes salivaires d'où ils sont expulsés lors d'un repas sanguin du moustique.

La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours et est fonction de la température et de l'espèce plasmodiale. Le développement diminue ou cesse avec le froid (environ 16°C pour *P. vivax*, 18°C pour *P. falciparum*) et s'arrête à la limite de 45°C.

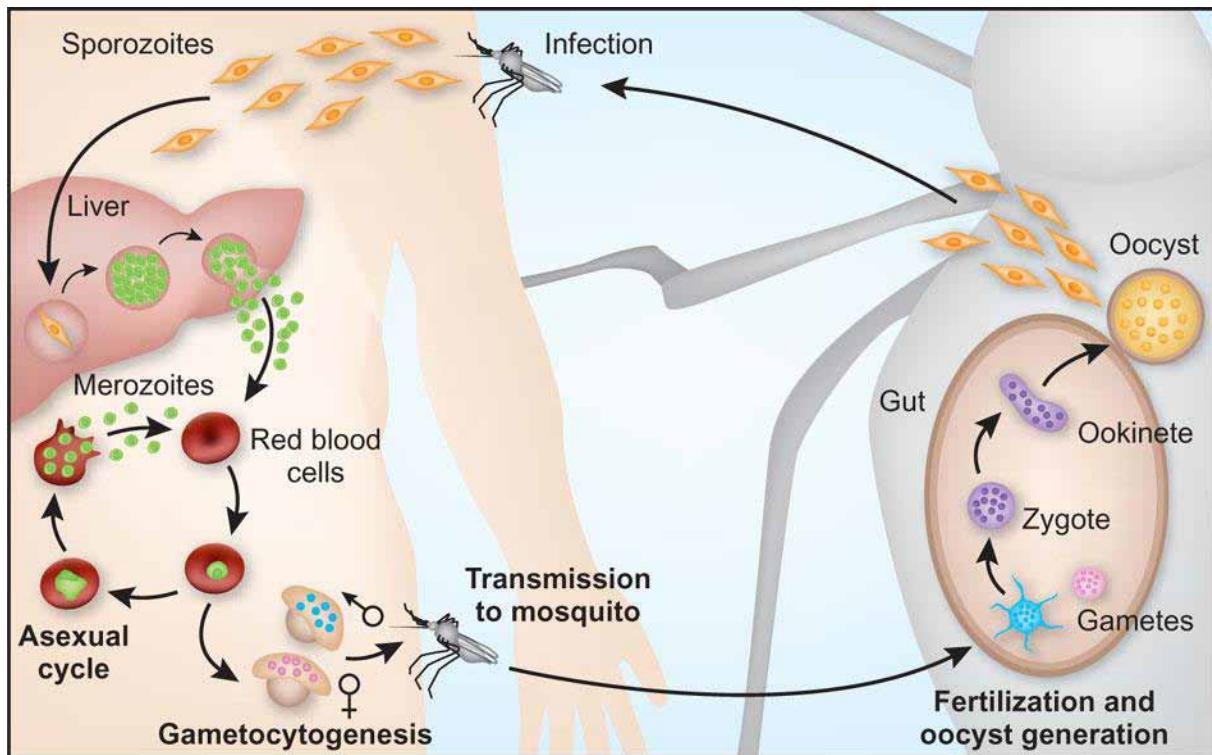


Figure 2: Cycle évolutif de *Plasmodium* spp (26).

2.5. Répartition géographique

Le paludisme est surtout retrouvé dans les zones intertropicales du globe. La transmission est élevée entre le 30° de latitude Nord et le 30° de latitude Sud (27). Ainsi :

- ❖ En Afrique intertropicale, dans tous les pays, sauf le Lesotho : le paludisme est du à *P. falciparum* (où il est majoritaire souvent à plus de 90%) et à *P. ovale* ou plus rarement à *P. malariae*.
- ❖ En Asie, la situation est la même qu'en Afrique, mais avec en plus de la prédominance de *P. falciparum* et celle de *P. vivax*.
- ❖ Dans l'océan Indien : Madagascar, Archipel des Comores, Zanzibar,
- ❖ En Amérique latine, il y a une diminution globale des cas, sauf au Honduras, en Colombie, en Guyane française et au Surinam. Il y a une forte proportion d'infection à *P. vivax*,
- ❖ En Asie : dans tous les pays de l'Asie du sud-est, sauf à Brunei; dans la plupart des pays d'Asie du centre-sud, en particulier Inde, Sri Lanka, Pakistan, Afghanistan, Bangladesh,
- ❖ Au Proche et au Moyen Orient : dans les pays de la zone, sauf à Bahreïn, et Qatar,
- ❖ Dans les Caraïbes : en Haïti et en République dominicaine
- ❖ En Océanie : aux Iles Salomon, au Vanuatu, en Papouasie Nouvelle Guinée

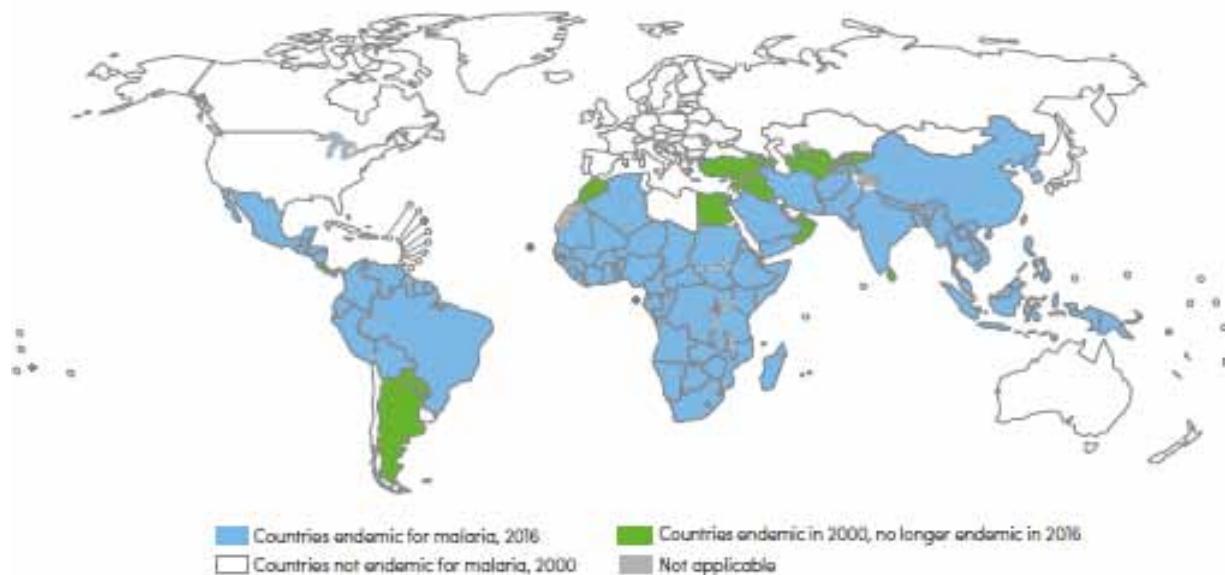


Figure 3 : Répartition globale de la malaria : pays endémiques en 2000 et en 2016 (28)

3. Résistance innée et immunité de l'hôte

3.1. Résistance innée

Il s'agit d'un état réfractaire à l'infection de l'érythrocyte par les plasmodes. Cet état est non immunologique et surtout conféré par certaines anomalies génétiques. Les causes de cette résistance innée sont les suivantes :

- ❖ Présence de l'hémoglobine S (siklémie ou drépanocytose), C et E
- ❖ Présence de l'hémoglobine F (protection du nouveau-né pendant les premières semaines de vie)
- ❖ Thalassémie chez l'adulte
- ❖ Déficit en G6PD
- ❖ Présence d'ovalocytes
- ❖ Présence d'elliptocytes (résistance vis-à-vis de *P. falciparum*)
- ❖ Présence des antigènes érythrocytaires du groupe Duffy notamment les noirs africains et américains (résistance innée au *Plasmodium vivax*)
- ❖ Autres facteurs : régime exclusivement lacté, déficient en acide para-amino-benzoïque, malnutrition protéique.

3.2. Prémunition

Il n'existe pas d'immunité innée contre le paludisme. Il existe en fait un état d'immunité acquise relative appelé prémunition. La prémunition est le résultat d'un processus lent et progressif qui donne une immunité partielle, non stérilisante incomplète. Elle est induite et entretenue par les charges parasitaires permanentes soit du fait de la longévité des parasites chez l'hôte, soit du fait des réinfections fréquentes. Cette immunité est spécifique d'espèces et de stades évolutifs du parasite.

Elle est labile et disparaît 12 à 24 mois après que le sujet ait quitté la zone d'endémie ou après une chimioprophylaxie antipalustre prolongée.

4. Formes cliniques

La gravité des manifestations du paludisme dépend de l'espèce plasmodiale, de la souche plasmodiale, de la densité parasitaire et du degré de prémunition de l'hôte. Nous décrivons ci-dessous, quelques formes cliniques.

4.1. Paludisme simple

Selon les directives de lutte contre le paludisme au Burkina Faso, un cas de paludisme simple est défini par une fièvre (température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C) ou un antécédent de corps chaud dans les 72 dernières heures et la mise en évidence du plasmodium à l'examen microscopique par goutte épaisse/frottis sanguin ou la positivité du test de diagnostic rapide (TDR).

4.2. Paludisme grave

Il se définit comme un cas de paludisme à *P. falciparum* associé à au moins un des 15 critères (cliniques ou biologiques) indiqués dans la liste dans le Tableau I en annexe (29).

4.3. Autres formes cliniques

❖ Le paludisme viscéral évolutif

Il survient en zone d'endémie chez des sujets soumis à des infections massives et répétées et dont les défenses immunitaires sont précaires. Le tableau clinique associe une splénomégalie, une fébricule, une anémie, et une altération de l'état. Non traité, l'évolution est variable : survenue de complications (anémie grave, œdème, dyspnée) de poussées hyperthermiques et la guérison devient lente. Sous traitement antipaludique (uniquement par la chloroquine), la guérison est lente mais spectaculaire.

❖ La fièvre bilieuse hémoglobinurique

Il s'agit d'un syndrome lié à *P. falciparum* qui serait dû à une sensibilisation à la quinine. C'est une forme rare qui se manifeste par un début brutal avec lombalgies, fièvre, rapidement suivie d'un ictère, d'une oligurie avec des urines coca-cola. Le pronostic est mauvais et dépend de la capacité de mise en route rapide d'une réanimation avec exsanguinotransfusion et épuration extra-rénale.

5. Diagnostic biologique du paludisme

5.1. Diagnostic biologique non spécifique

- ❖ Anémie normocytaire le plus souvent normochrome, parfois hypochrome ;
- ❖ Thrombopénie presque toujours observée ;
- ❖ Fonction hépatique souvent altérée de même que la fonction rénale ;
- ❖ Bilirubine totale augmentée ;
- ❖ CRP augmentée ;
- ❖ Acidose (pH < 7,35 ou bicarbonates < 15 mmol/L).

5.2. Diagnostic parasitologique

Il permet de mettre en évidence la présence du parasite dans le sang de façon directe ou indirecte.

❖ Diagnostique parasitologique direct

✓ Goutte épaisse et frottis sanguin mince

Ce sont les deux techniques les plus couramment utilisées. Complémentaires, elles doivent être systématiquement associées.

La goutte épaisse réalise une concentration des hématies parasitées et permet ainsi de détecter des parasitoses faibles avec un seuil de détection de 6 à 12 parasites/ μ l de sang.

Le frottis sanguin est moins sensible avec un seuil de détection de 50 parasites/ μ l de sang. Son intérêt réside dans le fait qu'il permet, outre la quantification de la parasitose, le diagnostic d'espèce et la mise en évidence des différents stades évolutifs du parasite.

✓ QBC (Quantitative Buffy Coat)

Le principe de cette technique microscopique de fluorescence repose sur l'utilisation d'un fluorochrome (l'acridine orange) capable de se fixer sur le noyau du parasite. La sensibilité de cette technique serait comparable à celle de la goutte épaisse pour des parasitoses supérieures à 100 parasites/ μ l. Elle varie de 41% à 93% pour des parasitoses inférieures à 100 parasites/ μ l. La spécificité pour *P. falciparum* est élevée (93-98%) mais chute à environ 50% pour les infestations causées par les autres espèces. Cependant elle ne permet pas de déterminer la densité parasitaire et le diagnostic d'espèce est difficile.

❖ **Examen parasitologique indirect**

On peut faire la culture de *Plasmodium* au laboratoire. En général la culture se fait dans le cadre de la recherche et non à but diagnostic. Elle permet notamment de faire des tests d'efficacité de médicaments antipaludiques sur les plasmodiums et des tests immunologiques ou de biologie moléculaire. La culture peut se faire à toutes les phases du cycle évolutif, pré-érythrocytaire, érythrocytaire, avec les gamètes ou à la phase sporogonique. Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (30). Un diagnostic indirect peut être obtenu par xénodiagnostic, après inoculation expérimentale de sang humain à des moustiques (30).

5.3. Diagnostic immunologique spécifique

❖ **Méthodes détectant les antigènes circulants**

Des tests de diagnostic rapide (TDR) basés sur la détection d'antigènes circulants, témoins de la présence du parasite, sont actuellement recommandés pour toute suspicion de paludisme avant l'administration des médicaments. Il s'agit de l'antigène HRP 2 (Histidine Rich Protéine 2) spécifique pour *P. falciparum*, de l'enzyme PLDH (Plasmodium Lactate Déshydrogénase) et de l'enzyme aldolase, communs aux autres espèces. Actuellement, pour c'est le TDR détectant HRP 2 et PLDH qui est utilisé dans les centres périphériques, les services d'urgence et la prise en charge du paludisme à domicile selon les recommandations du programme national de lutte (PNLP) contre le paludisme du Burkina Faso.

❖ **Méthodes sérologiques détectant les anticorps circulants**

En zone d'endémie, ces méthodes ne sont indiquées que dans certaines formes cliniques chroniques telles que le paludisme viscéral évolutif et la splénomégalie palustre hyper-immune, au cours desquelles les anticorps sont à des taux élevés alors que les recherches parasitologiques sont le plus souvent négatives. En zone d'hypoendémie, la sérologie peut être utile en rétrospectif en cas de traitement présomptif ou d'automédication. Elle reste par ailleurs très utilisée dans le dépistage des donneurs de sang dans le cadre de la prévention du paludisme post-transfusionnel et dans les enquêtes épidémiologiques. On utilise surtout l'immunofluorescence indirecte.

.5.4. Diagnostic moléculaire

Pour le diagnostic des espèces plasmodiale, la PCR multiplex est très sensible qui permet de détecter de très faibles parasitoses de l'ordre de 0,2-5 parasites/ μ l (31). Par contre, la PCR nichée conventionnelle demande plus de temps et la limite de détection est de l'ordre de 6 parasites/ μ l (31). Mais cette méthode est encore plus sensible que la PCR en une seule étape, même si le risque de contamination est plus élevé. La PCR permet en outre une différenciation de souches et on la réserve essentiellement à l'étude des mutations des gènes impliqués dans les résistances. Dans ce cas, la PCR nichée permet d'avoir une estimation plus spécifique et plus précise.

Différentes techniques post-PCR sont aussi utilisées notamment la digestion enzymatique par des enzymes de restriction ou le séquençage. La PCR en temps réel peut être aussi utile dans le cadre de la PCR quantitative (qPCR). La Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR) est utilisée pour mesurer l'expression de certains gènes, les fonctionnalités de certaines protéines.

Les techniques de biologie moléculaire sont devenues indispensables sur le plan fondamental mais ne sont pas utilisables pour le diagnostic biologique du paludisme dans les centres de santé. Des techniques plus adaptées aux équipes sur le terrain sont en train d'être mises au point, en particulier la technique LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) dont la technique est plus simple mais la mise au point et le matériel restent encore coûteux.

6. Lutte contre le paludisme

La stratégie de lutte comprend aussi bien les éléments de la prise en charge des cas et de prévention.

6.1. Prise en charge des cas de paludisme

Les médicaments pouvant être utilisés dans la lutte contre le paludisme peuvent être classés en schizontocides et gamétocytocides comme l'indique le Tableau II en annexe.

❖ Prise en charge du paludisme simple

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont choisies en fonction du niveau de résistance des plasmodes au médicament associé à l'artémisinine :

- ❖ Dans les régions de multirésistance (Asie du Sud-Est) : Dihydroartémisinine-Pipéraquine, Artésunate-Méfloquine ou Arteméther-Luméfantrine ;
- ❖ En Afrique : Arteméther-Luméfantrine, Artésunate-Amodiaquine, Artésunate-Sulfadoxine

Les CTA recommandées actuellement par l'OMS sont : Arteméther-Luméfantrine, Artésunate-Amodiaquine, l'Artésunate-Méfloquine, l'Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine (32). Les CTA recommandées par le PNLP du Burkina Faso sont : Arteméther-Luméfantrine, Artésunate-Amodiaquine (33).

❖ **Traitements du paludisme grave (33)**

La prise en charge du paludisme grave au Burkina Faso se fait actuellement à base de :

- ❖ Artésunate injectable ;
- ❖ Arteméther injectable ;
- ❖ Quinine injectable.

6.2. Prévention du paludisme

❖ **Prophylaxie individuelle**

Elle est réalisée à travers les stratégies suivantes :

- ❖ La chimioprophylaxie de la femme enceinte, du nourrisson, de l'enfant de moins de cinq ans et du voyageur.
- ❖ Le traitement préventif intermittent à base de sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes (TPIg-SP) : il consiste en l'administration de 3 comprimés de SP en une prise orale devant un agent de santé à partir du deuxième trimestre de la grossesse jusqu'à l'accouchement en respectant un intervalle d'au moins un mois entre deux prises. L'acide folique ne doit pas être administré en même temps que la SP car le fer inhibe l'action de la SP (les administrer donc à un intervalle de 24h).
- ❖ Le traitement préventif intermittent du paludisme chez le nourrisson (TPIn-SP) : consiste en l'administration de la SP à partir de l'âge de 3 mois au cours de la vaccination de routine du programme élargie de vaccination (PEV), soit 3 doses de SP aux nourrissons à 3, 4 et 9 mois.

- ❖ La chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants de moins de cinq (5) ans par administration de l'amodiaquine (AQ) + SP sous forme de campagne qui dure 3 jours par mois pendant 4 mois consécutifs au cours de la saison de haute transmission du paludisme.
- ❖ La lutte contre le contact Homme-vecteur basée essentiellement sur l'utilisation des répulsifs cutanés anti-moustiques et des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), le port des vêtements longs de préférence au couver du soleil.

❖ **Prophylaxie collective**

- ❖ Lutte anti-vectorielle : elle comprend la lutte anti-larvaire et la lutte contre les anophèles adultes ;
- ❖ Vaccins antipaludiques : plusieurs vaccins sont en développement. En 2013, L'OMS avait recensé 27 vaccins antipaludiques candidats au stade de premières phases d'essai clinique pour la plupart. Le RTS,S/AS01 est le seul vaccin ayant franchi la phase 3 avec des résultats encourageants (34). Les résultats montrent que chez les enfants de 5 à 17 mois, 1,774 cas de paludisme ont été évités en vaccinant 1000 enfants (35). En juillet 2015, l'Agence européenne des médicaments (EMA) a émis un avis réglementaire favorable concernant le rapport bénéfice/risque du vaccin. En octobre 2015, deux comités consultatifs de l'OMS ont recommandé de mener des projets pilotes de mise en œuvre du RTS,S/AS01 dans trois à cinq zones d'Afrique sub-Saharienne ayant des contextes épidémiologiques différents (36).

7. Association paludisme et grossesse

7.1. Immunité antipalustre pendant la grossesse

❖ Modifications de l'immunité antipalustre pendant la grossesse

Au cours de la grossesse l'immunité maternelle se modifie pour s'adapter à la présence du fœtus qui représente un allogreffe. Cela diminue l'immunité antipalustre. Cette modification de l'immunité est causée par la présence de substances immunosuppressives directement ou indirectement synthétisées par le placenta (37). En effet, au niveau de l'interface fœto-maternelle, le placenta inhibe l'induction de la réaction immunitaire maternelle anti-fœtale. Pour cela, il agit de trois manières:

- ❖ Il élève des barrières circulatoires, cellulaires, moléculaires : diverses substances revêtent (ou dédoublent) le trophoblaste et inhibent ainsi le déplacement des lymphocytes maternels ;
- ❖ Il modifie la présentation des antigènes de transplantation du produit de conception à l'interface fœto-maternelle les rendant peu reconnaissables par le système de défense immunitaire maternel ;
- ❖ Enfin, il inhibe les agents effecteurs de la réaction immunitaire anti-fœtale.

Cependant, cette barrière placentaire est facilement traversée par les immunoglobulines G (IgG) maternels qui confèrent au fœtus une immunité passive qui dure 4 à 6 mois après la naissance. La baisse de l'immunité maternelle est plus marquée au cours des premières grossesses. En effet, en zone d'endémie des anticorps de type IgG appelés "variant de surface" sont synthétisés par la jeune femme contre les antigènes plasmodiaux. Cette action est dirigée en particulier contre les protéines *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyt Membran Protein 1). Au cours des premières grossesses, les hématies parasitées s'agglutinent dans le placenta sous l'action de la chondroïtine sulfate A et empêchent l'action de ces anticorps IgG contre les protéines *PfEMP1*, expliquant ainsi la susceptibilité accrue des primigestes et des secondigestes au paludisme. En conséquence, il apparaît encore d'autres anticorps dirigés contre la chondroïtine sulfate A. Ces derniers anticorps apparaissent chez les primigestes à partir du deuxième trimestre. Par contre, du fait de l'exposition répétée, cette protection immunitaire apparaît plus tôt et se consolide au fil des grossesses (38).

❖ Immunité passive materno-transmissible

C'est le transfert *in utero* des IgG de la mère prémunie à son enfant, le protégeant ainsi pendant les 4 à 6 premiers mois de la vie. L'immunité de l'enfant dépend du niveau de la prémunition maternelle (37). Les enfants nés de mères vivant dans des zones de transmission stable de paludisme sont relativement plus protégés contre les formes graves (39).

7.2. Infestation placentaire

Les villosités placentaires baignent dans de larges sinus où le sang maternel circule au ralenti. Cet engorgement va causer un blocage des espaces intervilleux et une thrombose placentaire. Ces espaces entre les villosités deviennent un excellent refuge pour les globules rouges parasités par *P. falciparum*. L'accumulation des hématies parasitées, collant les unes aux autres, détruites sur place, crée un appel de macrophages. Par conséquent, l'espace vacuolaire utéro-placentaire demeure un site de séquestration et de développement des parasites. Ce qui va aboutir à une fibrose qui réduit le transport des micronutriments à travers le placenta et permet le passage de globules rouges parasités dans la circulation fœtale (40).

7.3. Influence réciproque entre paludisme et grossesse

❖ Retentissement de la grossesse sur le paludisme

Au cours de la grossesse, la prévalence et la gravité du paludisme augmentent dans les premières semaines, atteignent leur pic au deuxième trimestre, puis baissent jusqu'à l'accouchement (41). Les conséquences sont différentes selon le niveau d'endémicité paludéenne de la région considérée. En zone d'hyperendémie, l'immunité est solide et les manifestations pathologiques sont rares (42). En zone d'hypoendémie, l'immunité est précaire et le risque de contracter un paludisme patent est assez élevé chez la femme enceinte (41). Les signes classiques du paludisme y sont accentués et quel que soit l'âge de la grossesse, l'infestation palustre à *P. falciparum* est corrélée à un risque important d'évolution vers un paludisme grave en l'absence de traitement adapté.

❖ Retentissement du paludisme sur la grossesse

Le paludisme est une cause de grossesse pathologique. Les effets néfastes du paludisme sur la grossesse s'observent tout au long de la grossesse et aussi en période du post-partum.

- ✓ Au début, le paludisme entraîne une exacerbation des « signes sympathiques » de la grossesse. La nidation peut être perturbée en cas de paludisme viscéral évolutif avec une splénomégalie importante : la conséquence en est une grossesse extra-utérine. Le paludisme, provoquant une hémolyse, aggrave une anémie déjà fréquente chez les femmes enceintes. Aussi augmente-t-il le risque d'avortement, de retard de croissance intra-utérine (responsable du faible poids de naissance), et de mort fœtale in utero.
- ✓ A l'approche du terme et à l'accouchement, le paludisme est un facteur important de prématurité. Les dystocies dynamiques sont fréquentes et probablement liées à une hypoxie utérine.
- ✓ Dans le post-partum, une certaine hypogalactémie est constatée chez les mères infestées (mais cela ne contre-indique pas l'allaitement maternel).
- ✓ Enfin, le paludisme augmente la morbidité et la mortalité néonatales.

7.4. Lutte contre le paludisme pendant la grossesse

❖ Quelques particularités pour le diagnostic du paludisme dans le contexte de la grossesse

- ✓ En zone d'endémie, le paludisme pendant la grossesse est le plus souvent asymptomatique (42). De ce fait, il est essentiel d'avoir recours aux tests de diagnostic rapide (TDR) particulièrement pour le diagnostic de routine du paludisme pendant la grossesse dans un contexte où la microscopie n'est pas disponible (43).
- ✓ Le diagnostic de l'infestation placentaire se fait surtout dans le cadre de la recherche. On réalise une apposition ou une biopsie placentaire suivi d'un examen parasitologique ou anatomo-pathologique. C'est un diagnostic rétrospectif de l'infestation placentaire.

❖ **Prise en charge des cas de paludisme chez la femme enceinte**

✓ **TraITEMENT du paludisme simple chez la femme enceinte**

Au Burkina Faso, la quinine est le médicament recommandé pour le traitement du paludisme simple chez la femme enceinte quel que soit l'âge de la grossesse, à la posologie de 8 mg/Kg de quinine base (sans dépasser 480 mg par prise) toutes les 8 heures pendant 7 jours par voie orale. L'utilisation des CTA chez la femme enceinte après le premier trimestre de la grossesse est aussi recommandée depuis 2012 par le PNLP (33).

✓ **TraITEMENT du paludisme grave chez la femme enceinte**

La quinine injectable reste le médicament de choix dans la prise en charge du paludisme grave de la femme enceinte au Burkina Faso.

✓ **Prévention du paludisme chez la femme enceinte**

Elle est basée sur :

- Le traitement préventif intermittent pendant la grossesse avec la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIg-SP) ;
- L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA).

8. Résistance de plasmodium aux antipaludiques

8.1. Définition

Selon l'OMS, la chimiorésistance aux antipaludiques est l'aptitude d'une souche de parasite du paludisme à survivre et à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament antipaludique utilisé à des doses égales ou supérieures aux doses recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet (32).

8.2. Mécanisme de la chimiorésistance

La chimiorésistance est due à une mutation génétique au niveau de l'ADN du parasite. L'apparition de souches mutantes peut survenir de façon spontanée et peut se traduire par :

- ❖ une diminution d'affinité des récepteurs membranaires du parasite pour le médicament ;

- ❖ une altération structurale des enzymes parasitaires en relation avec l'action du médicament.
- ❖ Une diminution de l'affinité de la molécule antipalustre pour les récepteurs érythrocytaires;
- ❖ Une réduction des mécanismes de concentration.

8.3. Mécanisme de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

La SP est une combinaison d'antifolates. L'action de la pyriméthamine sur *P. falciparum* a pour cible la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) et celle de la sulfadoxine a pour cible la dihydroptéroate synthase (*Pfdhps*) (6). Ces deux enzymes interviennent dans la biosynthèse de l'acide folique, source d'énergie pour le parasite (6). Selon des études *in vitro* et *in vivo*, la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine est liée à une ou plusieurs mutations ponctuelles au niveau du gène *Pfdhfr* (44,45). Celle de la sulfadoxine est associée à des mutations du gène *Pfdhps* (46,47). La modification génétique entraîne une modification structurale protéïnique des enzymes les rendant peu sensibles ou insensibles à l'action de la SP (figure 3).

La mutation de *Pfdhfr* en position 108 (Ser→Asn) est le plus souvent la première à apparaître chez une souche plasmodiale présentant une résistance à la pyriméthamine. Puis apparaissent d'autres mutations ponctuelles aux positions 59 (Cys→Arg), 51(Asn→Ile), et 164(Ile→Leu) (44,45,48–51). La triple mutation *Pfdhfr* (51+59+108) est considérée comme le meilleur facteur prédictif de la résistance *in vivo* à la pyriméthamine (52,53). La mutation *Pfdhfr* 164 mais aussi les mutations Asn188Lys, Ser189Arg et Val213Ala, sont plus rares et peuvent être associées à des niveaux élevés de résistance à la pyriméthamine (52).

La résistance à la sulfadoxine est associée à une mutation du gène *Pfdhps* au codon 437 (Ala→Gly), parfois associée à d'autres mutations aux codons 581 (Ala→Gly), 436 (Ser→Phe), 540 (Lys→Glu) et 613 (Ala→Ser) (9,46–48,50,54). La mutation isolée Ala437Gly est la plus fréquente, mais la double mutation Ala437Gly + Lys540Glu augmente encore le risque de survenue de la résistance à la sulfadoxine (52). Les mutations aux points 581 et 613 du gène *Pfdhps* sont plus rares en Afrique et associées à une augmentation de la résistance (55,56).

Les associations des mutations des deux gènes augmentent aussi les niveaux de résistance à la SP. Ainsi, la quadruple mutation *Pfdhfr* (51+59+108) + *Pfdhps* 437 est aussi décrite en Afrique comme étant associée à des résistances à la SP (57). La quintuple mutation, c'est-à-dire la combinaison de la triple mutation *Pfdhfr* (51+59+108) et de la double mutation *Pfdhps* (437+540) multiplie le risque de résistance in vivo à la SP par 5,2 (53).

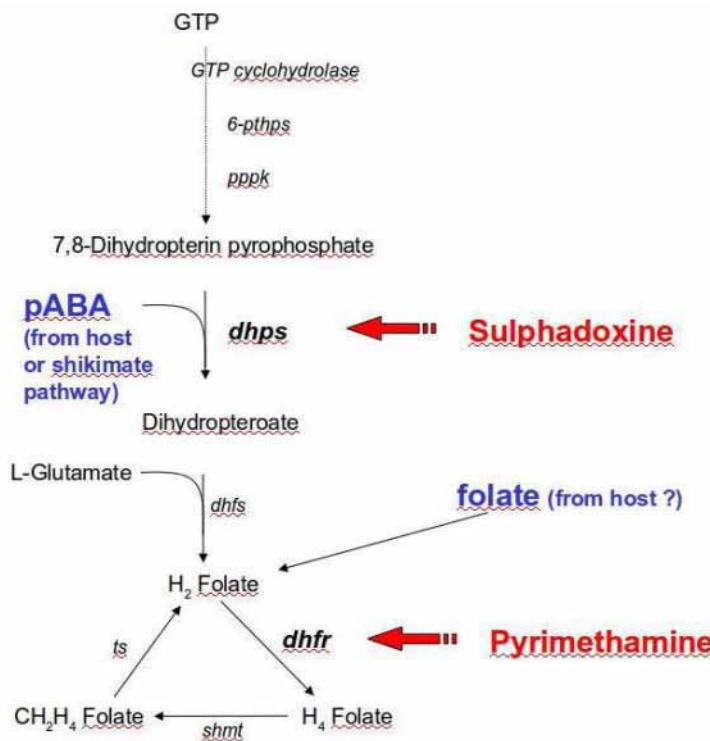


Figure 4 : Biosynthèse des folates et sites d'action de la Sulfadoxine-Pyriméthamine (58).

8.4. Facteurs favorisant la propagation de la chimiorésistance

Plusieurs facteurs interviennent dans l'apparition et la propagation de la chimiorésistance :

- ❖ La pression médicamenteuse : l'administration de faibles doses d'antipaludiques (prophylactiques ou infra cliniques) peut contribuer à sélectionner chez le malade des parasites asexués résistants. La rapidité de la sélection est directement proportionnelle à la pression médicamenteuse, au nombre de parasites exposés et au taux de mutation chez

le parasite. Elle augmente aussi avec la longueur de la demi-vie de l'antipaludique utilisé. Par ailleurs, l'apparition de la chimiorésistance peut être due à une résistance croisée avec des antipaludiques présentant une parenté structurale ou un mécanisme d'action semblable (59,60).

- ❖ La présence d'une population non immune ou faiblement immune : l'apparition de la résistance est tardive chez les sujets prémunis et résidant en zones d'endémie palustre et se manifeste précocement chez les sujets non immuns (52,61).
- ❖ Le niveau de transmission du paludisme (59,61).
- ❖ L'avantage biologique des souches résistantes sur les souches sensibles (52).
- ❖ Les mouvements des populations humaines et/ou anophélienne (62).

8.5. Méthodes d'étude de la chimiorésistance

Il existe trois principales méthodes d'étude de la chimiorésistance (63):

- ❖ Les tests *in vivo* ont été standardisés par l'OMS, ces tests permettent d'évaluer l'efficacité des traitements antipaludiques. Des patients souffrant de paludisme sont sélectionnés, traités avec un antipaludique puis sont suivis sur le plan clinique et biologique pendant 28 ou 42 jours. Les résultats sont définis en termes d'échec thérapeutique précoce (ETP), d'échec clinique tardif (ECT), d'échec parasitologique tardif (EPT) et de réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA).
- ❖ Les tests *ex vivo* basés sur la capacité des médicaments à inhiber la croissance du plasmodium en milieu de culture.
- ❖ Les techniques de biologie moléculaire ont permis l'élucidation des mécanismes moléculaires de la chimiorésistance et l'identification de marqueurs moléculaires de la chimiorésistance du plasmodium aux antipaludiques.

9. Revue de la littérature sur la résistance de *P. falciparum* à la SP pendant la grossesse

9.1. Résistance à la SP chez les femmes enceintes au Burkina Faso

- ❖ Coulibaly *et al.* avaient rapporté un taux d'échec parasitologique tardif de 6,5% au cours d'une étude sur l'efficacité de la SP chez les femmes enceintes conduite en 2010 dans le district sanitaire de Ziniaré. De plus, les analyses PCR avant l'administration de la SP avaient montré que 44,9% des parasites portaient la triple mutation *Pfdhfr*. Toutefois il n'y avait aucune mutation 164L, 540E et 581G (5).
- ❖ Pendant la même période, une étude transversale faite à Nonoro par Tahita *et al.* avait révélé une faible proportion de la triple mutation du gène *Pfdhfr* de 11,4% (17).

9.2. Mutations conférant la résistance à la SP chez les femmes enceintes en Afrique

- ❖ Au Bénin, Bertin *et al.* ont rapporté une prévalence des triple et quadruple mutations de 85% en 2011 (10). De plus, selon Moussiliou *et al.* en 2013, la prévalence de la triple mutation était d'au moins 80% (64).
- ❖ Au Ghana, une étude menée par Mockenhaupt *et al.* en 2008 a révélé que la proportion de la triple mutation a doublé entre 1998 et 2006 en passant de 36% to 73% (16).
- ❖ En 2015 au Nigéria, Iwalokun *et al.* ont trouvé des prévalences de 35% et de 5% respectivement pour la triple mutation *Pfdhfr* et la quintuple mutation (triple mutation *Pfdhfr* + double mutation *Pfdhps*) (15).
- ❖ En 2010 au Gabon, Bouyou-Akotet *et al.* ont rapporté des proportions de 80%, 53% et 22% respectivement pour la triple, quadruple et quintuple mutation (65).
- ❖ Au Cameroun, la prévalence de la triple mutation était de 96% six ans après l'adoption du TPIg-SP. De plus, les proportions des mutations du gène *Pfdhps* aux codons 437, 581 et 613 étaient respectivement de 76,5%, 5,9% et 11,8% (66).
- ❖ En République Démocratique du Congo, la quintuple mutation avait été rapportée en 2015 avec une prévalence de 33% (67).
- ❖ En Ouganda, une augmentation de la triple mutation et de la quintuple mutation avait été rapportée par Mbonye *et al.* au cours d'une étude de surveillance épidémiologique. La proportion de ces mutations variaient de 90% à 100%, respectivement avant et après la prise du TPIg-SP (68).

- ❖ Au Kenya, une étude publiée par Iriemenam *et al.* en 2012 avait montré une augmentation de la quintuple mutation de 7 à 88% entre 1996 et 2009 (69).
- ❖ En Tanzanie, la quintuple et la sextuple mutation avaient été rapportées par Minja *et al.* en 2013 avec des proportions respectives de 46,3%, et 44,4% (70).
- ❖ Au Mozambique, selon une étude publiée par Raman *et al.*, la fréquence de la triple mutation est passée de 26% en 1999 à 96% en 2003 (11).
- ❖ En Zambie, Tan *et al.* ont rapporté une prévalence de la quintuple mutation de 63% en 2014 (71).
- ❖ Au Malawi, Lin *et al.* ont rapporté la quadruple mutation avec une proportion de 100% en 2013 (72). La sextuple mutation (y compris la mutation du gène *Pfdhps* au point 581) avait été retrouvée avec une proportion de 8,4% au cours d'une autre étude conduite par Gutman *et al.* de 2009 à 2011 (73).

DEUXIEME PARTIE :

NOTRE TRAVAIL

1. Question de recherche

Quel est le profil des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* chez les femmes enceintes à Bobo-Dioulasso, 5 ans après l'adoption du TPIg-SP ?

2. Hypothèse de recherche

Les femmes enceintes vues lors des consultations prénatales (CPN) dans la ville de Bobo-Dioulasso hébergent dans leur sang des plasmodiums avec une fréquence de polymorphisme élevée au niveau de gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*.

3. Objectifs

3.1. Objectif général

Etudier le profil des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* chez les femmes enceintes à Bobo-Dioulasso, 5 ans après l'adoption du TPIg-SP.

3.2. Objectifs spécifiques

- ❖ Déterminer la proportion des mutations des gènes *Pfdhfr* (51, 59, 108 et 164) et *Pfdhps* (437 et 540) chez les femmes enceintes à Bobo-Dioulasso ;
- ❖ Comparer la proportion des mutations des gènes *Pfdhfr* (51, 59, 108 et 164) et *Pfdhps* (437 et 540) en fonction de la prise du TPIg-SP ;
- ❖ Déterminer les facteurs associés à la survenue des mutations.

4. Méthodologie

4.1. Sites de collecte des échantillons de l'étude

La collecte des échantillons s'est déroulée en 2010 à Bobo-Dioulasso, ville situé à 365 km de la capitale Ouagadougou, dans le Sud-Ouest du Burkina Faso. Bobo-Dioulasso est dans la zone soudanienne (Sud-Soudanienne) qui est la partie la plus arrosée avec une saison pluvieuse longue de 6 mois (mai à octobre). La transmission du paludisme y est saisonnière de juin à décembre. En 2000, le taux d'inoculation entomologique (TIE) était d'environ 60 piqûres infestantes/personne/année dans la ville de Bobo-Dioulasso (74).

Les données de la présente étude ont été collectées dans deux centres de santé et de promotion sociale (CSPS) périphériques de la ville de Bobo-Dioulasso : Lafiabougou (secteur 20) et Kua (secteur 24).

❖ **Centre de santé et de promotion sociale du secteur 24 (Kua)**

Ce centre de santé fait partie de l'aire sanitaire du district sanitaire de Dafra. En 2010, la population du district était estimée à 260 593 habitants (recensement général de la population 2006 réactualisée). La couverture en CPN₂ était de 94, 12% en 2008. En 2010, le CSPS a enregistré en moyenne 200 CPN par mois.

❖ **Centre de santé et de promotion sociale du secteur 20 (Lafiabougou)**

Cette formation sanitaire fait partie du district sanitaire de Dô. La population du district était estimée en 2010 à 463 070 habitants (recensement général de la population 2006 réactualisée). La couverture en CPN₂ était de 61, 19% en 2008. En 2010, le CSPS a enregistré en moyenne 200 CPN par mois et le nombre de grossesses attendues était de 967.

4.2. Type et période d'étude

La collecte des données cliniques et biologiques de cette étude a été réalisée au cours d'une enquête transversale conduite par Cissé *et al.* entre Septembre et Décembre 2010 dans les CSPS de Lafiabougou et Kua (75).

Notre travail de mémoire de master a consisté à effectuer une analyse biomoléculaire des confettis de sang collectés au cours de cette précédente étude. Elle s'est déroulée de Juillet 2015 à Avril 2016.

4.3. Population d'étude

Pour la présente étude ont été incluses :

- ❖ Les femmes enceintes ayant donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude ;
- ❖ Les femmes enceintes aux 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestres reçues en CPN dans les CSPS de Lafiabougou et Kua ;
- ❖ Les femmes enceintes ayant une goutte épaisse positive à *P. falciparum* et un confetti de sang collecté.

4.4. Taille d'échantillon

En nous basant sur une prévalence attendue des mutations génétiques de 50% chez les femmes enceintes présentant une goutte épaisse positive dans la ville de Bobo-Dioulasso et en considérant un niveau de confiance de 95%, un échantillon de **97** cas permettra d'estimer la prévalence de mutations au sein de la population des femmes enceintes dont la goutte épaisse était positive avec une précision de $\pm 10\%$. En prenant en compte un taux de confettis non exploitables estimé à 8%, la taille finale d'échantillon a été estimée à **105** confettis.

4.5. Echantillonnage

Il a été procédé à une inclusion systématique de toutes les femmes enceintes chez qui la goutte épaisse était positive. La collecte de confettis a été faite selon un échantillonnage stratifié en fonction de l'âge de la grossesse en trois strates à savoir :

- ❖ La strate des femmes enceintes au 1^{er} trimestre de la grossesse (entre la 3^{ème} SA et la 15^{ème} SA);
- ❖ La strate des femmes enceintes au 2^{ème} trimestre de la grossesse (entre la 16^{ème} SA et la 28^{ème} SA) ;
- ❖ La strate des femmes enceintes au 3^{ème} trimestre de la grossesse (entre la 29^{ème} SA et la 41^{ème} SA).

4.6. Variables étudiées

- ❖ Données sociodémographiques: âge ;
- ❖ Des antécédents obstétricaux : c'est surtout le nombre de grossesses ;
- ❖ Histoire de la grossesse : nombre de CPN et nombre de prises du TPIg-SP notifié sur le carnet de santé ;
- ❖ Données biologiques : densité parasitaire, taux d'hémoglobine, fréquence des mutations du gène *Pfdhfr* (51, 59, 108,164) et du gène *Pfdhps* (437 et 540).

4.7. Collecte des données

Toutes les données ont été collectées sur des fiches de collecte individuelles.

❖ Données sociodémographiques, les antécédents obstétricaux et l'histoire de la grossesse

Ces données ont été collectées chez des femmes enceintes venues en CPN dans les CSPS suscités. Ces données ont été collectées par la technique d'interview à travers un questionnaire et en vérifiant les informations dans le carnet de santé de la participante et le registre de maternité.

❖ Données de laboratoire

Les prélèvements de goutte épaisse et de frottis mince ont été faits au bout du doigt, les lames ont été colorées au Giemsa 10 % pendant 20 minutes et la lecture des lames a été faite par deux techniciens différents, en cas de discordance les lames ont été lues par un troisième lecteur.

Le taux d'hémoglobine a été mesuré à l'aide d'un appareil HEMOCUE®.

❖ Recherche des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Elle s'est déroulée au Laboratoire de Parasitologie-Entomologie avec le plateau technique de biologie moléculaire du Centre MURAZ et au Molecular cell biology Laboratory de l'Université de Legon, à Accra au Ghana. Cette phase du travail a comporté deux étapes :

❖ L'extraction de l'ADN

Le protocole utilisé dans cette étude est dénommé « DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit) » du kit QIAGEN (Annexe 3). L'ADN a été extrait à partir de confettis de sang périphérique séché. Le principe de l'extraction de l'ADN est le suivant :

- ✓ Lyse des membranes cellulaires et nucléaires sous l'action d'un détergent (tampon ATL) ;
- ✓ Élimination des protéines (protéinase K1) ;
- ✓ Élimination des autres acides nucléiques (ARN ...) (tampon AL) ;
- ✓ Précipitation de l'ADN sous l'action de l'alcool (Ethanol) ;
- ✓ Lavage de l'ADN à travers une membrane (tampons AW1 et AW2) ;

- ✓ Elution de l'ADN génomique à partir de la membrane (tampon AE).

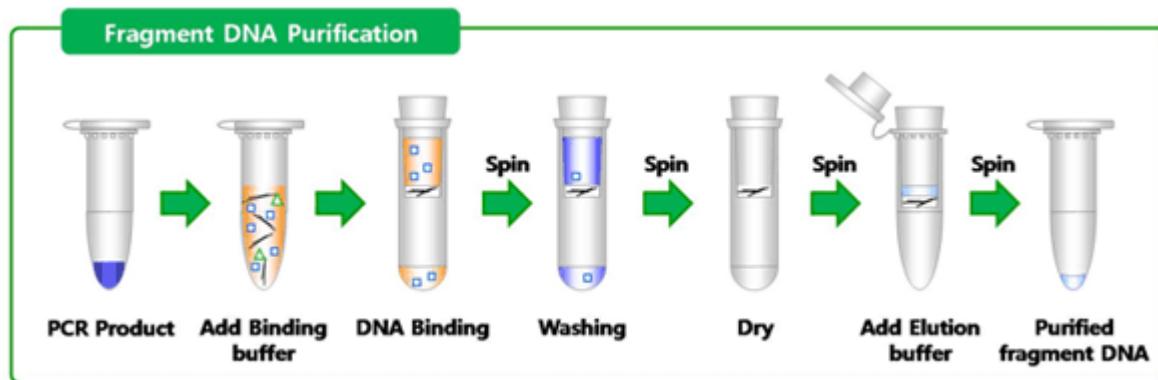


Figure 5 : Principe de l'extraction de l'ADN

❖ La recherche des mutations par la technique de PCR nichée

La recherche de mutation comporte 3 phases : l'amplification de l'ADN, la digestion enzymatique avec les enzymes de restriction et la révélation des produits de la digestion. Le protocole utilisé dans cette étude est celui décrit par Vlahos *et al.*, 2004 (Annexe 4).

✓ La phase d'amplification de l'ADN

Il s'agit de l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la zone du génome de *P. falciparum* auquel on s'intéresse, c'est-à-dire des zones où sont situées les éventuelles mutations géniques. Nous avons utilisé la technique de PCR nichée. On effectue deux jeux de cycles d'amplification avec 4 amores, désignées couples d'amores externe et interne. Chaque cycle d'amplification est une succession de trois étapes : dénaturation et séparation des deux brins d'ADN, hybridation des amores et enfin élongation et synthèse du brin spécifique. Le premier jeu de cycles d'amplification implique l'utilisation des amores externes. Le second jeu d'amplification se fait avec les amores internes. Cette technique de PCR nichée permet finalement d'avoir des amplicons plus courts après l'utilisation des amores internes et d'éviter ainsi les amplifications non spécifiques. Ce qui augmente la sensibilité et la spécificité. Les amores ainsi que les cycles d'amplification sont différents

selon les gènes auxquels on s'intéresse et sont présentés respectivement dans les Tableaux I et II.

Tableau I: Réactifs et conditions de la PCR pour le gène *Pfdhfr*

PCR et round de PCR	Amorces de PCR *	Conditions de la PCR
DHFR 51, 59, 108, 164 1er tour de PCR†	A1: 5'-TTTATATTTCTCCTTTA (20bp) A2: 5'-CATTATTATTCGTTTCT (20bp) (ce sont des Amorces modifiées, Durasingh utilise M1 & M5)	Dénaturation initiale : 94°C x 3min PCR: 5 cycles 94°C x 45s, 54°C x 45s, 72°C x 1.5m 35 cycles 94°C x 30s, 56°C x 30s, 72°C x 45s Elongation finale : 72°C x 10 min Hold @ 4 °C
DHFR 51, 108, 164 2nd tour de PCR†	A3 : 5'- GTCTGCGACGTTTCGATATTATGC (26bp) F1 5'- AAATTCTTGATAAACAAACGGAACCTttTA (29bp) (ce sont des Amorces modifiées, Durasingh utilise M3 & F/)	Dénaturation initiale : 94°C x 3 min PCR: 5 cycles 94°C x 45s, 50°C x 45s, 72°Cx 1,5min 35 cycles 94°C x 30s, 54°C x 30s, 72°C x 45s Elongation finale : 72°C x 10 min Hold @ 4 °C
DHFR 59 2nd tour de PCR ‡	F:5'- GAAATGTAATTCCCTAGATATGgAAT ATT (29bp) M4: 5'- TTAATTCCCAAGTAAAATATTAGAg CTTC (31bp)	Dénaturation initiale : 94°C x 2 min PCR 5 cycles 94°C x 45s, 48°C x 45s, 72°Cx 1,5 min 30 cycles 94°C x 30s, 50°C x 30s, 72°C x 45s Elongation finale : 72°C x 10 min Hold @ 4 °C

* les nucléotides en petits caractères ne sont correspondants.

† développé par Staedke et Sendagire

‡ De: Duraisingh MT, Curtis J and Warhurst DC. Plasmodium falciparum: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes by PCR and restriction digestion. Exp Parasitol 1998;89:1-8.

Tableau II : Réactifs et conditions de la PCR pour le gène *Pfdhps*

PCR et round de PCR	Amorces de PCR *	Conditions de la PCR
DHPS 437/540 1er tour de PCR ‡	R1: 5' - AACCTAACGTGCTGTTCAA (20bp) R2: 5' - AATTGTGTGATTGTCCACAA (21bp)	Dénaturation initiale : 94°C x 3 min PCR 40 cycles 94°C x 1m, 45°C x 45s, 72°C x 1 min Elongation finale : 72°C x 10 min Hold @ 4 °C
DHPS 437/540 2nd tour de PCR ‡	K: 5' - TGCTAGTGTATAGATATAGGatGAGcATC (30bp) K1: 5' -CTATAACGAGGTATTgCATTAAATgCAAGAA (31bp)	PCR 5 cycles of 94°C x 2m, 45°C x 2m, 72°Cx 1,5 min 35 cycles 94°C x 1m, 45°C x 1 min, 72°C x 1 min Elongation finale : 72°C x 10 m Hold @ 4 °C

* les nucléotides en petits caractères ne sont correspondants

† développé par Staedke et Sendagire

‡ De: Duraisingh MT, Curtis J and Warhurst DC. Plasmodium falciparum: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes by PCR and restriction digestion. Exp Parasitol 1998;89:1-8.

✓ **La digestion enzymatique**

C'est une technique post-PCR utilisant des enzymes de restriction qui permettent de lyser en des sites bien précis des produits de PCR afin de réaliser les manipulations des gènes. Le protocole que nous avons utilisé est décrit dans l'annexe 4. Les produits de PCR obtenus après digestion enzymatiques feront l'objet d'une migration sur gel d'agarose.

✓ **La révélation des produits de la digestion enzymatique par migration**

On réalise une migration des produits de digestion à travers du gel. Ces produits sont séparés graduellement en fonction de leur poids moléculaire et donc en fonction du nombre de pairs de bases. La taille des différents fragments de chaînes de nucléotides permet de détecter les éventuelles mutations chez la souche de parasite présente dans l'échantillon correspondant. Dans cette étude nous avons utilisé du gel d'agarose. Le protocole de préparation du gel d'agarose ainsi que les procédures d'interprétation des résultats sont présentés dans l'annexe 4.

4.8. Définitions opérationnelles

- ❖ **Anémie maternelle** : elle a été définie par un taux d'Hb (hémoglobine) < 11 g/dl.
- ❖ **Paucigestes** : ce terme désigne les gestantes qui sont à leur première ou deuxième grossesse.
- ❖ **Multigestes** : ce sont les femmes enceintes ayant un nombre de grossesses supérieur ou égal à 3.
- ❖ **Triple mutation** : il s'agit de toutes les mutations haplotypiques comportant à la fois des mutations au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr*.
- ❖ **Quadruple mutation** : ce sont des mutations haplotypiques comportant à la fois des mutations au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr* et une mutation au niveau du codon 437 du gène *Pfdhps*.

4.9. Analyse des données

La saisie et l'analyse des données ont été faites respectivement à l'aide des logiciels Microsoft Excel version 2013 et Stata version 13.

Nous avons d'abord décrit les caractéristiques de base de la population avant d'étudier les variables d'intérêt. Les infestations mixtes (présence de génotype sauvage et mutant à la fois) ont été considérées comme des mutations. Les proportions des mutations ont été comparées avec le test de Khi carré de Pearson ou le test exact de Fisher. Les comparaisons entre les moyennes ont été faites en utilisant le test de Student.

La densité parasitaire étant une variable non continue, le logarithme décimal de cette variable a été considéré afin d'obtenir une nouvelle variable continue, cela pour pouvoir utiliser les tests paramétriques usuels cités.

Des analyses univariées et multivariables ont été effectuées grâce à des modèles de régression logistique pour rechercher d'éventuels facteurs associés à la présence des mutations. Les tests de comparaison ont été considérés comme étant significatifs à un seuil statistique de 0,05.

4.10. Considérations Ethiques

La collecte des données de cette étude a été faite en respectant les règles d'éthique en matière de recherche clinique. Avant la participation à l'étude, chaque participante a reçu des informations complètes sur les buts, objectifs et méthodes de l'étude. Les femmes enceintes étaient libres de participer à l'étude et un consentement libre et éclairé écrit a été obtenu auprès de chaque participante avant son inclusion dans l'étude. En outre aucune intervention médicamenteuse ou invasive n'a été faite sur les sujets de l'étude. Les participantes ont bénéficié d'une prise en charge médicamenteuse en cas de paludisme diagnostiqué pendant l'étude et de tout autre symptôme présenté.

Des précautions ont été prises au cours de cette étude pour assurer la confidentialité des données recueillies. L'analyse biomoléculaire des confettis avait été accordée avant la collecte des données par le Comité d'éthique national pour la recherche en santé du Burkina Faso (CENRS, N°2010-054).

5. Résultats

Parmi les 105 confettis inclus dans notre étude, seuls 92,4% (97/105) ont pu être analysés avec succès par la PCR.

5.1. Caractéristiques générales de la population de l'étude

Le Tableau III résume les caractéristiques générales de la population. L'âge moyen des femmes enceintes était de 23 ans \pm 4,9. Plus de la moitié des femmes enceintes était non scolarisée (64,9%) et les paucigeste représentaient 71,1% de l'échantillon. Seulement 8,3% et 20,6% des femmes enceintes avaient bénéficié respectivement d'au moins trois CPN et deux doses de SP à la date de notre enquête.

Tableau III: Caractéristiques générales de la population d'étude

Variables	Effectif (N=97)	Pourcentage
Âge moyen (ans) ± écart type	$23 \pm 4,9$	
Groupes d'âge		
< 20	23	23,7
20-25	49	50,5
> 25	25	25,8
Profession		
Femme au foyer	92	94,8
Autres	5	5,2
Niveau d'éducation		
Scolarisées	63	64,9
Non scolarisées	34	35,1
Gestité		
Paucigestes	69	71,1
Multigestes	28	28,9
Age de la grossesse		
1 ^{er} trimestre	44	45,4
2 ^{ème} trimestre	33	34
3 ^{ème} trimestre	20	20,6
Nombre de CPN		
< 3 CPN	89	91,7
≥ 3 CPN	8	8,3
Nombre de doses de SP		
0 dose	77	79,4
1 dose	12	12,4
2 doses	8	8,2
Anémie		
Présente	69	71,1
Absente	28	28,9
Taux d'hémoglobine moyen (g/dl) ± écart type	$9,88 \pm 1,68$	
Moyenne géométrique des densités parasitaires,	2329 parasites/ μ L (1789-3031)	

5.2. Prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Au total 97, 9% (95/97) des échantillons analysés contenaient au moins une mutation du gène *Pfdhfr*. La mutation du gène *Pfdhfr* au codon 51 était la plus représentée avec une proportion de 86,6%, suivie de la mutation *Pfdhfr* 108 (70,1%) (Tableau IV). Parmi les doubles mutations, la double mutation *Pfdhfr* (51 et 108) était la plus rencontrée avec une proportion de 61,9%. La prévalence de la triple mutation *Pfdhfr* était de 24,7%.

Au niveau du gène *Pfdhps*, seule la mutation au point 437 a été retrouvée avec une proportion de 79,4% (Tableau IV). La proportion de la quadruple mutation était de 19,6%.

Les échantillons analysés ne contenaient pas les mutations *Pfdhfr* I164L et *Pfdhps* K540E.

Tableau IV : Répartition de la proportion des différentes mutations

Mutations	Effectif (N=97)	Pourcentage
<i>Pfdhfr</i> 51	84	86,6
<i>Pfdhfr</i> 59	35	36,1
<i>Pfdhfr</i> 108	68	70,1
<i>Pfdhfr</i> 164	0	0
<i>Pfdhps</i> 437	77	79,4
<i>Pfdhps</i> 540	0	0
Double mutation <i>Pfdhfr</i> (51 et 59)	30	30,9
Double mutation <i>Pfdhfr</i> (51 et 108)	60	61,9
Double mutation <i>Pfdhfr</i> (59 et 108)	28	28,9
Triple mutation <i>Pfdhfr</i> (51, 59 et 108)	24	24,7
Quadruple mutation <i>Pfdhfr</i> (51, 59 et 108) et <i>Pfdhps</i> 437	19	19,6

5.3. Facteurs associés aux triples et quadruples mutations

❖ Facteurs associés à la triple mutation

L'analyse univariée montre que les femmes enceintes de plus de 25 ans (OR brut = 4,44 ; IC à 95% : [1,03-19,01]) et les multigestes (OR brut = 2,8 IC à 95% : [1,05-7,34]) avaient significativement plus de risque d'héberger des parasites ayant la triple mutation (Tableau V). Cependant, même si chez les femmes ayant reçu au moins 2 doses de SP, l'odd-ratio était de 3,5, cette association n'était pas statistiquement significative (OR brut = 3,52 ; IC à 95% : [0,79-15,61]).

Avec l'analyse multivariable, aucun des facteurs testés n'était associé à la triple mutation.

Tableau V : Facteurs associés à la triple mutation

Variables	Triple	OR ^b brut	OR ajusté	P
Age				
< 20 ans	13,0% (3/23)	1	1	-
20-25 ans	22,5% (11/49)	1,92 [0,48-7,72]	1,71 [0,40-7,34]	0,46
> 25 ans	40,0% (10/25)	4,44 [1,03-19,01] ^c	3,02 [0,54-16,9]	0,20
Gestité				
Paucigestes	18,8% (13/69)	1	1	-
Multigestes	39,3% (11/28)	2,78 [1,05-7,34] ^c	1,89 [0,54-6,58]	0,31
Age de la grossesse				
1 ^{er} trimestre	15,9% (7/44)	1	1	-
2 ^{ème} trimestre	30,3% (10/33)	2,29 [0,76-6,88]	1,71 [0,52-5,59]	0,13
3 ^{ème} trimestre	35,0% (7/20)	2,84 [0,83-9,67]	3,13 [0,48-20,39]	0,09
Nombre de doses de SP				
0 dose	22,1% (17/77)	1	1	-
1 dose	25,0% (3/12)	1,17 [0,28-4,83]	0,36 [0,04-3,01]	0,35
2 doses	50,0% (4/8)	3,52 [0,79-15,61]	1,74 [0,24-12,32]	0,57

^bOR = Odd-Ratio ^c P < 0,05

❖ Facteurs associés à la quadruple mutation

Nous n'avons trouvé aucun facteur associé à la quadruple mutation ni avec l'analyse univariée ni avec l'analyse multivariable (Tableau VI).

Tableau VI : Facteurs associés à la quadruple mutation

Variables	Quadruple mutation	OR brut	OR ajusté	P
Age				
< 20 ans	13% (3/23)	1	1	-
20-25 ans	18,4% (9/49)	1,5 [0,36-6,16]	1,44 [0,33-6,20]	0,63
> 25 ans	28% (7/25)	2,59 [0,58-11,5]	2,40 [0,41-13,91]	0,32
Gestité				
Paucigestes	17,4% (12/69)	1	1	-
Multigestes	25% (7/28)	1,58 [0,55-4,56]	1,14 [0,30-4,36]	0,84
Age de la grossesse				
1er trimestre	15,9% (7/44)	1	1	-
2ème trimestre	60% (6/33)	1,17 [0,35-3,89]	0,94 [0,26-3,41]	0,8
3ème trimestre	6 (30%)	2,26 [0,64-7,92]	1,71 [0,24-12,09]	0,9
Nombre de doses de SP				
0 dose	13 (16,9%)	1	1	-
1 dose	3 (25%)	1,64 [0,39-6,90]	0,82 [0,09-7,16]	0,86
2 doses	3 (37,5%)	2,95 [0,62-13,92]	2,01 [0,26-15,26]	0,49

5.4. Relation entre la présence des mutations et les morbidités palustres

❖ Relation entre la présence des mutations, la densité parasitaire et le taux d'hémoglobine

Dans le Tableau VII, nous avons comparé les moyennes des taux d'hémoglobine et des densités parasitaires chez les femmes hébergeant la triple mutation et la quadruple mutation et chez celles n'ayant pas ces mutations. Les taux d'hémoglobine moyens chez les femmes enceintes ayant la triple mutation et la quadruple mutation étaient similaires à ceux des femmes enceintes n'ayant pas ces mutations ($P > 0,05$). De même, les moyennes arithmétiques des logarithmes décimaux des densités parasitaires n'étaient pas différentes chez les femmes enceintes ayant la triple mutation et la quadruple mutation comparées à celles des femmes enceintes n'ayant pas de mutation ($P > 0,05$).

Tableau VII: Relation entre présence des mutations, densité parasitaire et taux d'hémoglobine

	Triple mutation		P	Quadruple mutation		P
	Oui	Non		Oui	Non	
Taux d'hémoglobine moyen \pm écart type	9,83 \pm 0,72	9,89 \pm 0,39	0,87	9,9 \pm 0,88	9,87 \pm 0,37	0,96
Densité parasitaire moyenne^d \pm écart type	3,44 \pm 0,11	3,34 \pm 0,07	0,10	3,45 \pm 0,11	3,34 \pm 0,06	0,11

^dMoyenne arithmétique du Log10 de la densité parasitaire

❖ **Relation entre présence des mutations et anémie**

La proportion de femmes anémierées était plus élevée chez les femmes qui hébergeaient la triple mutation et la quadruple mutation que chez celles qui n'avaient pas de parasites mutés (Tableau VII). Toutefois, la différence n'était pas statistiquement significative.

Tableau VIII: Relation entre la présence des mutations et l'anémie

	Anémie		P
	Oui	Non	
Triple mutation			
Oui	80,8% (17/24)	29,2% (7/24)	
Non	71,2% (52/73)	28,8% (21/73)	0,97
Quadruple mutation			
Oui	68,4% (13/19)	31,6% (6/19)	
Non	71,8% (56/78)	28,2% (22/78)	0,77

6. Discussion

6.1. Contraintes et limites de l'étude

Cette étude s'est déroulée avec certaines difficultés qui ne devraient toutefois pas affecter la qualité des données collectées ainsi que leur analyse. Les contraintes étaient surtout d'ordre financier ou matériel. En effet, les échantillons ont été collectés uniquement chez des femmes enceintes venues en CPN. Cela pourrait avoir comme conséquence un biais de sélection car un recrutement systématique des femmes enceintes dans la communauté aurait été plus représentatif des souches circulant chez les femmes enceintes.

6.2. Prévalence des mutations *Pfdhfr* et *Pfdhps*

Dans cette étude, nous n'avons pas enregistré de mutations *Pfdhfr* 164L et *Pfdhps* 540E. Ce résultat est similaire aux données rapportées dans d'autres études au Burkina Faso chez les femmes enceintes (5,17) d'une part et d'autre part chez les enfants et dans la population générale (76–78). Nous avons aussi noté que 24,7% et 19,6% de nos échantillons portaient la triple mutation et la quadruple mutation respectivement. Au Burkina Faso, Tahita *et al.* avaient rapporté au cours de la même période chez des femmes enceintes à Nanoro, une prévalence de la triple mutation plus faible (11,4%) (17). Coulibaly *et al.* avaient trouvé une prévalence de la triple mutation plus élevée (44,9%) au cours de la même période à Ziniaré, chez des femmes enceintes n'ayant reçu aucune dose de SP (5).

Ces différences pourraient être dues à une différence de pression médicamenteuse entre les différentes zones du Burkina. La relation entre la pression médicamenteuse avec l'administration de SP et l'apparition des mutations a été rapportée dans plusieurs études (11–14). En effet, en ce qui concerne le Burkina Faso, avant l'adoption de la SP en TPI chez les femmes enceintes, ce médicament était utilisé en première intention dans le traitement du paludisme simple. Compte tenu de certaines difficultés d'application des directives comme la non disponibilité des CTA ou l'automédication, la mise en œuvre de l'utilisation des CTA peut être retardée dans certaines zones semi-rurales comme Ziniaré, au profit de l'utilisation de la SP dans la population générale. En particulier une faible pression médicamenteuse de la SP à Nanoro pourrait être liée au fait que des essais thérapeutiques aient été menés sur les CTA au cours de cette période dans cette zone au profit de la population.

La différence entre nos résultats et ceux des différentes études menées au Burkina Faso pourrait s'expliquer aussi par la différence des niveaux d'endémicité. En fait, la relation entre le niveau d'endémicité et la survenue et la propagation des résistances n'est pas encore clairement élucidée. Selon certaines études, en zone d'hypo-endémie, les infestations monoclonales sont fréquentes, ce qui fait que le contact de ces souches avec le médicament antipaludique est plus fréquent (13,79). De ce fait, dans une population peu immune comme celle des femmes enceintes, cela peut entraîner une augmentation de la biomasse de parasites chez les individus et être un facteur favorisant l'émergence des souches résistantes (80,81).

Au Mali, Coulibaly *et al.* avaient également rapporté des taux plus faibles de la triple mutation (4,7%) et de la mutation de *Pfdhps* 437 (21,4%). Ces proportions plus faibles pourraient être dues à une pression médicamenteuse plus faible au Mali que dans notre zone d'étude.

Au Bénin, dans une étude conduite par Moussiliou *et al.*, les quadruples mutations ont été rapportées en 2013 chez plus de 80% des femmes enceintes durant la même période (64). Au Nigeria, Iwalokun *et al.* ont rapporté une prévalence plus élevée de triple mutation de 35% (15). En Afrique centrale au Gabon, Bouyou-Akotet *et al.*, au cours d'une enquête avait rapporté la triple mutation, la quadruple mutation et la quintuple mutation respectivement à des proportions élevées de 80%, 53% et 22% (65). Au Cameroun, Chauvin *et al.* ont publié des prévalences élevées de la triple mutation à 96% ainsi que des mutations du gène *Pfdhps* 437, 581 et 613 respectivement à 76,5%, 5,9% et 11,8% (66).

Ces différentes prévalences rapportées sont plus élevées que celles retrouvées dans notre zone d'étude et pourraient être liées au fait que la pression médicamenteuse soit plus importante dans ces différentes zones de l'Afrique qu'au Burkina Faso.

Ces différences pourraient aussi être en relation avec un niveau d'endémicité plus élevée dans ces régions par rapport à notre zone d'étude. En effet, selon certains auteurs, il est probable que dans les zones hyper-endémiques, les résistances se propagent plus vite dans la population (13,82,83). Ceci est surtout valable pour les résistances qui sont induites par des mutations sur un seul gène pour une molécule donnée. Même avec une multiplicité des clones, il y a une compétition entre les souches, ce qui va faciliter la recolonisation de

l'organisme par les souches mutantes après l'élimination des souches susceptibles par la chimioprévention (84).

Au Malawi, Lin *et al.* ont rapporté une proportion de quadruple mutation de 100% en 2013 (72). En Zambie, Tan *et al.* ont trouvé une prévalence de la quintuple mutation de 63% en 2014 (71). En Tanzanie, la quintuple mutation et la sextuple mutation ont été rapportées par Daniel *et al.* en 2013 à des proportions élevées respectives de 46,3% et 44,4% (70). En Ouganda, Mbonye *et al.* ont montré une augmentation de la prévalence de la triple mutation *Pfdhfr* qui est passée de 90,7% à 100% après une dose de SP (68). Tous ces résultats montrent que la propagation de la résistance à la SP est beaucoup plus avancée dans ces deux régions orientale et australe de l'Afrique. Cela pourrait être dû à une pression médicamenteuse plus importante dans ces deux régions. L'émergence des résistances peut être liée à l'utilisation anarchique des antipaludiques dans un contexte démographique marqué par les mouvements des populations secondaires aux guerres ou à la famine dans l'est de l'Afrique (85). En outre, une étude de la dynamique des lignées des souches mutantes pour le gène *Pfdhps* montrent qu'il se pourrait que les mutations de ce gène aient pour origine l'Asie du Sud-Est (57).

6.3. Facteurs associés à la fréquence des mutations

❖ Variation des proportions de mutations en fonction des prises de SP

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé une association entre la prise de la SP et la présence des mutations. Nos résultats corroborent ceux rapportés au Ghana (16) et au Gabon (65). Toutefois, dans d'autres études, la prise du TPIg-SP était associée à une hausse significative de la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* (8–10,64,86). Des études de cohorte prospective sont nécessaires pour mieux élucider la relation entre la prise de SP et la survenue des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*.

❖ Variation de la proportion des mutations en fonction de la gestité

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les proportions de mutations chez les multigestes et celle des paucigestes à l'analyse multivariable. Ces résultats sont en contradiction avec les données de la littérature (15,87). En effet, on s'attendrait à ce

qu'il y ait plus de mutations chez les paucigestes étant donné que ces femmes ont une immunité antipalustre plus faible comparées aux multigestes (15,38,87) et que la faible immunité pourrait favoriser la propagation de la résistance.

❖ Variation des proportions de mutations en fonction de l'âge

L'âge pourrait être un facteur influençant la diminution de la fréquence des mutations chez les femmes enceintes. En effet, une baisse d'immunité antipalustre favorise la sélection des parasites résistants (88,89). Aussi, la susceptibilité des femmes enceintes vis-à-vis du paludisme diminue au fil des grossesses (15,38,87). Si l'on suppose que le nombre de grossesses augmente avec l'âge, alors la fréquence des mutations devrait diminuer avec l'âge. Cependant, dans notre étude, il n'y avait pas d'association entre l'âge et la fréquence des mutations. Une cohorte prospective aurait permis de mieux élucider cette question.

❖ Morbidités palustres liées à la présence des mutations

Notre étude a montré qu'il n'y avait pas d'association entre la présence de mutations et l'anémie. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les mutations n'avaient pas eu un impact significatif sur les densités parasitaires, en témoignent les travaux de Menendez *et al.* au Mozambique (86).

CONCLUSION

Conclusion

La chimiorésistance est l'un des principaux facteurs qui entravent la lutte contre le paludisme en particulier chez la femme enceinte. L'épidémiologie moléculaire est indispensable pour comprendre la répartition et la dynamique de l'évolution des marqueurs conférant la résistance aux antipaludiques.

Les prévalences de la triple mutation *Pfdhfr* et de la quadruple mutation bien qu'élevées étaient à des niveaux acceptables dans cette étude. De plus, nous n'avons pas enregistré de mutations *Pfdhfr* 164L et *Pfdhps* 540E. Ce qui pourrait prouver indirectement que l'utilisation de la SP est toujours bien indiquée, cinq ans après l'adoption du TPIg-SP comme méthode de prévention contre le paludisme pendant la grossesse au Burkina Faso. Cependant, nos résultats ne reflètent que la situation à Bobo-Dioulasso d'il y a six ans. En outre, du fait de l'utilisation accrue de ce médicament dans des stratégies comme la chimioprévention du paludisme saisonnier chez les enfants de moins de cinq ans, il se pourrait qu'il y ait une augmentation de la pression médicamenteuse pouvant contribuer à l'émergence des souches résistantes. Cela suggère une mise à jour de ces données sur les marqueurs de résistance et sur l'efficacité de la SP afin de prendre des mesures plus adéquates pour le contrôle du paludisme pendant la grossesse.

En tout état de cause, vu l'évolution rapide de la chimiorésistance à la SP à travers le monde, il s'avère indispensable de rechercher des alternatives à la SP. Les regards sont de plus en plus tournés vers les CTA. Selon les dernières directives du PNLP, les CTA peuvent être utilisés chez les femmes enceintes. Des auteurs proposent d'utiliser ces combinaisons, non pas en traitement préventif intermittent, mais en traitements curatifs intermittents.

REFERENCES

Références

1. World Health Organization. World Malaria Report 2015. World Health Organ. Geneva, Switzerland; 2015;(978 92 4 156515 8):243.
2. MS. Annuaire Statistique Santé 2015. Ouagadougou, Burkina Faso; 2016.
3. Bates I, Fenton C, Gruber J, Laloo D, Lara AM, Squire SB, et al. Reviews Vulnerability to malaria , tuberculosis , and HIV / AIDS infection and disease . Part 1 : household level. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:267-77.
4. Kiszewski AE, Teklehaimanot A. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(Suppl 2):128-35.
5. Coulibaly SO, Kayentao K, Taylor S, Guiro EA, Khairallah C, Guindo N, et al. Parasite clearance following treatment with sulphadoxine-pyrimethamine for intermittent preventive treatment in Burkina-Faso and Mali: 42-day in vivo follow-up study. *Malar J.* 2014;13:41.
6. Sridaran S, McClintock SK, Syphard LM, Herman KM, Barnwell JW, Udhayakumar V. Antifolate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malar J.* 2010;9:247.
7. Watkins WM, Sibley CH, Hastings IM. The search for effective and sustainable treatments for *Plasmodium falciparum* malaria in Africa: A model of the selection of resistance by antifolate drugs and their combinations. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(2):163-73.
8. McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2085-91.
9. Basco LK, Tahar R, Ringwald P. Molecular basis of in vivo resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1811-4.
10. Bertin G, Briand V, Bonaventure D, Carrieu A, Massougbodji A, Cot M, et al. Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment of pregnant women in Benin. *Malar J.* 2011;10:196.
11. Raman J, Sharp B, Kleinschmidt I, Roper C, Streat E, Kelly V, et al. Differential effect of regional drug pressure on dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutations in Southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(2):256-61.
12. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(4):209-18.
13. Talisuna AO, Bloland P, Alessandro D, Alessandro UD. History , Dynamics , and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):235-54.
14. Watkins WM, Mosobo M. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-

- sulfadoxine: Selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87(1):75-8.
15. Iwalokun BA, Iwalokun SO, Adebodun V, Balogun M. Carriage of Mutant Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase Genes among *Plasmodium falciparum* Isolates Recovered from Pregnant Women with Asymptomatic Infection in Lagos, Nigeria. *Med Pract.* 2015;24(5):436-43.
 16. Mockenhaupt FP, Bedu-addo G, Eggelte TA, Hommerich L, Holmberg V, Oertzen C Von, et al. Rapid Increase in the Prevalence of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance among *Plasmodium falciparum* Isolated from Pregnant Women in Ghana. *J Infect Dis.* 2008;198:1545-9.
 17. Tahita MC, Tinto H, Erhart A, Kazienga A, Fitzhenry R, VanOvermeir C, et al. Prevalence of the dhfr and dhps Mutations among Pregnant Women in Rural Burkina Faso Five Years after the Introduction of Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137440.
 18. Duval L. *Plasmodium* chez les grands singes africains1. *Rev Primatol.* 2012;4(14).
 19. Lv Z, Wu Z, Zhang L, Ji P. Genome mining offers a new starting point for parasitology research. *Parasitol Res.* 2015;
 20. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419:498-511.
 21. McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. Common Origin and Fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps Mutations Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in a Low-Transmission Area in South America. *Antimicrob agents Chemother.* 2007;51(6):2085-91.
 22. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in *Plasmodium falciparum* Malaria: Implications for Vaccine Design. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):686-707.
 23. Petrarca V, Petrangeli G, Rossi P, Sabatinelli G. Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): The *Anopheles gambiae* complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages. 189-191. *Ann Ist Super Sanita.* 1996;22:189-91.
 24. Majorii G, Sabatinelli G, and Coluzzi M. Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Med Vet Entomol.* 1987;1:185-92.
 25. ANOFEL. Paludisme. Paris/ France; 2014.
 26. Pasvol G. Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet.* 2010;42(4):284-285.
 27. Aubry P, Gaüzère B. Paludisme Actualités 2015. Medecine Tropicale- Diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien. 2015.
 28. WHO. World Malaria Report 2016. Geneva, Switzerland; 2016.

29. Siqueira-Batista A, Gomes P, Vitorino RR, Costa A de P, Gomes de Mendonça E, Oliveira M, et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 2000. p. 90.
30. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium spp.* *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):355-64.
31. OMS. Note d'orientation sur le diagnostic du paludisme dans les contextes de faible transmission Septembre 2014 Cadre général. Geneva, Switzerland; 2014.
32. World Health Organisation. Guidelines for the treatment of malaria- Third Edition. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Guidelines. Geneva, Switzerland; 2015.
33. PNLP. Directives nationales pour la prise en charge du paludisme dans les formations sanitaires du Burkina Faso- Révision de mars 2014. Ouagadougou; 2014.
34. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Leach A, Lievens M, et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *N engl j med.* 2016;374(26):2519-29.
35. MVI. Malaria vaccine candidate has demonstrated efficacy over 3-4 years of follow-up. Press Release. London, England; 2014;1-3.
36. WHO, MALVAC. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. *Weekly Epidemiol Rec.* 2016;91(4):33-52.
37. Fievet N, Varani S, Ibitokou S, Briand V, Louis S, Perrin RX, et al. *Plasmodium falciparum* exposure in utero, maternal age and parity influence the innate activation of foetal antigen presenting cells. *Malar J.* 2009;8(251):251.
38. Gamain B, Smith JD, Viebig NK, Gysin J, Scherf A. Pregnancy-associated malaria: Parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol.* 2007;37(3-4):273-83.
39. King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, et al. Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol.* 2002;168(1):356-64.
40. Ahmadou M, Troye-Blomberg M, Akum, AE Kuoh A, Minang J, Achibom B. The effect of maternal, umbilical cord and placental malaria parasitaemia on the birthweight of newborns from South-western Cameroun. *Acta Pædiatrica.* 2005;94:917-23.
41. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(2):93-104.
42. Tagbor H, Bruce J, Browne E, Greenwood B, Chandramohan D. Malaria in pregnancy in an area of stable and intense transmission: Is it asymptomatic? *Trop Med Int Health.* 2008;13(8):1016-21.
43. Singer LM, Newman RD, Diarra A, Moran AC, Huber CS, Stennies G, et al. Evaluation of a malaria rapid diagnostic test for assessing the burden of malaria during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(5):481-5.
44. Cowman AF, Morry JM, Biggs BA, Cross AG, Foote SJ. Amino Acid Changes Linked to

- Pyrimethamine Resistance in the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(23):9109-13.
45. Peterson DS, Walliker D, Wellemes TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(23):9114-8.
 46. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethylidihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*. 1994;224(2):397-405.
 47. Triglia T, Wang P, Sims PFG, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J*. 1998;17(14):3807-15.
 48. Peterson DS, Milhous WK, Wellemes TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(8):3018-22.
 49. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(8):3014-7.
 50. Basco LK, de Pecoulas PE, Le Bras J, Wilson CM. *Plasmodium falciparum*: molecular characterization of multidrug-resistant Cambodian isolates. *Exp Parasitol*. 1996;82(2):97-103.
 51. Mockenhaupt FP, Eggelte TA, Bohme T, Thompson WN, Bienzle U. *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase alleles and pyrimethamine use in pregnant Ghanaian women. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(1):21-6.
 52. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogueau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. Revue francophone des laboratoires. 2010;422:51-62.
 53. Picot S, Olliaro P, Monbrison F De, Bienvenu L, Price RN, Ringwald P. between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J*. 2009;8(89).
 54. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, et al. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2002;185:380-8.
 55. Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, Sibley CH, et al. Towards an Understanding of the Mechanism of Pyrimethamine-Sulfadoxine Resistance in *Plasmodium falciparum*: Genotyping of Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of Kenyan Parasites. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):991-6.
 56. Plowe C V, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley P, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*.

- 1997;176(6):1590-6.
57. Pearce RJ, Pota H, Evehe MSB, Bâ EH, Mombo-Ngoma G, Malisa AL, et al. Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med.* 2009;6(4):e1000055.
 58. Martinelli A, Henriques G, Cravo P, Hunt P. Whole genome re-sequencing identifies a mutation in an ABC transporter (mdr2) in a *Plasmodium chabaudi* clone with altered susceptibility to antifolate drugs. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*; 2011;41(2):165-71.
 59. Djiré AA. Analyse de l'évolution de la chimiorésistance du paludisme au Burkina Faso de 1992-1998. Université de Ouagadougou; 1999.
 60. Banjara MR, Imwong M, Petmitr S, Sirawaraporn W. Factors associated with regional bias of Pfcrt (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) haplotypes in Napal. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 2011;42(1):1-8.
 61. Ouédraogo Y. Etude de la chimiorésistance in vivo/in vitro de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine en milieu urbain de Bobo-Dioulasso en 1997. Université de Ouagadougou; 1998.
 62. Guiguemdé T, Gbary A, Ouédraogo J, Gayibor A, Lamizana L, Maïga A, et al. Point actuel sur la chimiorésistance du paludisme des sujets autochtones dans les Etats de l'OCCGE (Afrique de l'Ouest). *Ann Soc Belge Méd Trop.* 1991;71:199-207.
 63. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva 27, Switzerland; 2009.
 64. Moussiliou A, De Tove YS-S, Doritchamou J, Luty AJF, Massougbedji A, Alifrangis M, et al. High rates of parasite recrudescence following intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during pregnancy in Benin. *Malar J.* 2013;12(195).
 65. Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP, Tchantchou T de D, Kombila M. High prevalence of sulfadoxine/pyrimethamine-resistant alleles of *Plasmodium falciparum* isolates in pregnant women at the time of introduction of intermittent preventive treatment with sulfadoxine/pyrimethamine in Gabon. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):438-41.
 66. Chauvin P, Sandie M, Iriart X, Nsango SE, Tchioffo MT, Luc A, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant *pfdhfr/pfdhps* alleles. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(5).
 67. Koukouikila-Koussouda F, Bakoua D, Fesser A, Nkombo M, Vouyoungui C, Ntoumi F. High prevalence of sulphadoxine-pyrimethamine resistance-associated mutations in *Plasmodium falciparum* field isolates from pregnant women in Brazzaville, Republic of Congo. *Infect Genet Evol.* 2015;33:32-6.
 68. Mbonye AK, Birungi J, Yanow SK, Shokoples S, Malamba S, Alifrangis M, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* resistance markers to sulfadoxine-pyrimethamine among pregnant women receiving intermittent preventive treatment for Malaria in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 2015;59(9):5475-82.
69. Iriemenam NC, Shah M, Gatei W, van Eijk AM, Ayisi J, Kariuki S, et al. Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug-resistance molecular markers in *Plasmodium falciparum* parasites from pregnant women in western Kenya. *Malar J*. 2012;11(1):134.
 70. Minja DTR, Schmiegelow C, Mmbando B, Boström S, Oesterholt M, Magistrado P, et al. *Plasmodium falciparum* Mutant Haplotype Infection during Pregnancy Associated with reduced Birthweight, Tanzania. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1446-54.
 71. Tan KR, Katalenich BL, Mace KE, Nambozi M, Taylor SM, Meshnick SR, et al. Efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine for intermittent preventive treatment of malaria in. *Malar J*. 2014;13:227.
 72. Lin JT, Mbewe B, Taylor SM, Luntamo M, Meshnick SR, Ashorn P. Increased prevalence of dhfr and dhps mutants at delivery in Malawian pregnant women receiving intermittent preventive treatment for malaria. *Trop Med Int Health*. 2013;18(2):175-8.
 73. Gutman J, Kalilani L, Taylor S, Zhou Z, Wiegand RE, Thwai KL, et al. The A581G Mutation in the Gene Encoding *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthetase Reduces the Effectiveness of Sulfadoxine-Pyrimethamine Preventive Therapy in Malawian Pregnant Women. *J Infect Dis*. 2015;211:1997-2005.
 74. Tinto H, Zoungrana EB, Coulibaly SO, Ouedraogo JB, Traoré M, Guiguemde TR, et al. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine efficacy for uncomplicated malaria treatment and haematological recovery in children in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso during a 3-year period 1998-2000. *Trop Med Int Health*. 2002;7(11):925-30.
 75. Cisse M, Sangare I, Lougue G, Bamba S, Bayane D, Guiguemde RT. Prevalence and risk factors for *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women attending antenatal clinic in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *BMC Infect Dis*. 2014;14(631).
 76. Geiger C, Compaore G, Coulibaly B, Sie A, Dittmer M, Sanchez C, et al. Substantial increase in mutations in the genes pfdhfr and pfdhps puts sulphadoxine-pyrimethamine-based intermittent preventive treatment for malaria at risk in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. 2014;19(6):690-7.
 77. Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouedraogo JB, Rosenthal PJ. Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(1):162-5.
 78. Tinto H, Ouédraogo JB, Zongo I, Van Overmeir C, Van Marck E, Guiguemdé TR, et al. Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(4):608-13.
 79. Arnot D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92:580-585.

80. White N, Pongtavornpinyo W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc R Soc Lond Ser B*. 2003;270:545–554.
81. White N. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia*. 1999;41:301–308.
82. Hastings I. Modelling parasite drug resistance: lessons for management and control strategies. *Trop Med Int Health*. 2001;6:883–890.
83. Hastings I, D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today*. 2000;16:340-7.
84. Majori G, Sabatinelli G, Coluzzi M. Efficacy of Permethrin-impregnated curtains for malaria vectors control. Geneva, Switzerland; 1987.
85. Lynch C, Roper C. The Transit Phase of Migration: Circulation of Malaria and Its Multidrug-Resistant Forms in Africa. *PLoS Med*. 2011;8(5):e1001040.
86. Menendez C, Serra-Casas E, Scahill MD, Sanz S, Nhabomba A, Bardaji A, et al. HIV and placental infection modulate the appearance of drug-resistant *Plasmodium falciparum* in pregnant women who receive intermittent preventive treatment. *Clin Infect Dis*. 2011;52(1):41-8.
87. Chico RM, Cano J, Ariti C, Collier TJ, Chandramohan D, Roper C, et al. Influence of malaria transmission intensity and the 581G mutation on the efficacy of intermittent preventive treatment in pregnancy: Systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health*. 2015;20(12):1621-33.
88. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 13-36.
89. Obi R, Okangba C, Nwanebu F, Ndubuisi U, Orji N. Premunition in *Plasmodium falciparum* malaria. *African J Biotechnol*. 2010;9(10):1397-401.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Critères de gravité du paludisme

Le paludisme grave est défini par une parasitémie positive à *P. falciparum* chez un malade présentant au moins un des signes cliniques et biologiques suivants :

Tableau Ia: Liste des critères cliniques et des critères biologiques du paludisme grave

Critères cliniques	Précisions du texte de l'OMS
Coma vrai: neuropaludisme	Score de Glasgow < 10
	Score de Blantyre < 3
Troubles de la conscience	Score de Glasgow < 15 et > 9
	Score de Blantyre < 5 et > 2
Respiration acidosique	Détresse respiratoire chez l'enfant
Convulsions répétées	> 1/24 heures
Collapsus cardiovasculaire	Pression artérielle systolique < 80 mm Hg signes périphériques d'insuffisance respiratoire
Œdème pulmonaire	Définition radiologique
Saignement anormal	Définition clinique
Ictère	Définition clinique
Hémoglobinurie macroscopique	Uries rouges foncées ou noires
Critères biologiques	Précisions du texte de l'OMS
Anémie sévère	Enfant: Hb < 5 g/dl
	Adulte: Hb < 7 g/dl
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/l (40 mg/dL)
Acidose métabolique	Bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques > 5 mmol/l
Hyperparasitémie	Parasitémie ≥ 4% chez le sujet non immun
Insuffisance rénale	Créatininémie > 265 µmol/l (> 3 mg/dl)

Annexe 2 : Classification pharmaco-thérapeutique sommaire des antipaludiques

Tableau IIa : Classification pharmaco-thérapeutique sommaire des antipaludiques

<u>Point d'impact</u>	<u>Origine</u>	<u>Mode d'action</u>	<u>Médicaments</u>
Schizontocides	Antipaludiques naturels	Groupe I (Action rapide, résistance longue difficile à apparaître)	Quinine Qinghaosu témidine)
	Antipaludiques de synthèse		<ul style="list-style-type: none"> ○ <u>Amino-4-quinoléines</u> Chloroquine amodiaquine ○ <u>Amino-alcools</u> méfloquine halofantrine ○ <u>Dérivés témidine</u> artémether artésunate artééther
		Groupe II (Action lente résistance, rapide aisée à obtenir)	<ul style="list-style-type: none"> ○ <u>Antifoliques</u> sulfones sulfamides ○ <u>Antifoliniques</u> biguanides diaminopyrimidines
Gamétoctocides		Amino-8-quinoléines	Primaquine

Annexe 3 : Protocole de l'extraction de l'ADN

Protocol: DNA Purification from Dried Blood Spots (QIAamp DNA Mini Kit)

(Traduit de l'anglais au français)

Ce protocole est destiné à la purification de l'ADN total (genomique, mitochondrial, and viral) à partir de sang traité ou non avec des anticoagulants et séché sur papier filtre (Schleicher and Schuell 903).

Important à savoir avant de commencer

- ❖ Toutes les centrifugations sont exécutées à température ambiante (15–25°C).
- ❖ Avant de commencer :
 - Préparer un bain d'eau à 85°C pour l'étape 2, un autre bain d'eau à 56°C pour l'étape 3 et un autre bain d'eau à 70°C pour l'étape 4.
 - Disposer du tampon AE ou de l'eau distillée à température ambiante (15–25°C) pour l'élution à l'étape 10.
 - S'assurer que les tampons AW et AW2 ont été préparés selon les instructions mentionnées sur les flacons correspondant.
 - Si un précipité se forme dans les tampons AL et ATL, incuber à 56°C pour permettre la dissolution de ce précipité.

Procédures modifiés

1. Découper 3 morceaux circulaires de papier filtre sur lequel se trouve le sang séché à analyser. Ces morceaux de sang sont placés dans un tube pour microcentrifugation de 1,5 ml. Ajouter 180 µL du tampon ATL.
2. Incuber à 85°C pendant 10 min. Centrifuguer brièvement afin de dégager les gouttes sur la fermeture des tubes.
3. Ajouter 20 µl de la solution de protéinase K. Agiter au vortex et incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuguer brièvement afin de dégager les gouttes sur la fermeture des tubes. NB : l'ajout de la protéinase K est essentiel.

4. Ajouter à l'échantillon 200 µl de tampon AL. agiter à fond en vortexant et incuber à 70°C pendant 10 min. Centrifuger brièvement afin de dégager les gouttes sur la fermeture des tubes. Pour qu'il ait lyse il est indispensable d'ajouter le tampon AL et d'agiter vigoureusement immédiatement. NB : ne pas ajouter directement la protéinase K au tampon AL. Un précipité blanc peut se former après l'ajout du tampon AL. dans la plupart des cas, ce précipité va se dissoudre pendant l'incubation. Ce précipité n'interfère pas avec le reste de la procédure.
5. Ajouter 200 µl d'éthanol (96–100%) à l'échantillon et agiter vigoureusement au vortex. Centrifuger brièvement afin de dégager les gouttes sur la fermeture des tubes. L'ajout de l'éthanol est indispensable, avant de bien agiter.
6. Transvaser le mélange obtenu à l'étape 5 dans un tube collecteur à colonne de 2 ml type « QIAamp Mini spin column ». Cette opération doit se faire sans mouiller le bord du tube. Bien fermer et centrifuger à 8.000 rpm (ou 6.000 x g) pendant 1 min. Placer la colonne du tube dans un autre tube collecteurs (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat. Fermer chaque tube à colonne pour éviter la formation d'aérosol pendant la centrifugation.
7. Ouvrir prudemment la colonne et ajouter 500 µl du tampon AW1 sans mouiller la bordure. Bien fermer le tube et la colonne et centrifuger à 8.000 rpm (ou 6.000 x g) pendant 1 min. Placer dans un nouveau collecteur de 2 ml (fourni dans le kit), jeter le filtrat contenu dans le tube collecteur.
8. Ouvrir prudemment la colonne et ajouter 500 µl du tampon AW2 sans mouiller la bordure. Bien fermer le tube et la colonne et centrifuger à 14.000 rpm (ou 20.000 x g) pendant 3 min.
9. Recommandation : Placer dans un nouveau collecteur de 2 ml (non fourni dans le kit) et jeter le filtrat contenu dans l'ancien tube collecteur. Centrifuger à vitesse maximale (14.000 rpm ou 20.000 x g) pendant 1 min. cette étape aide à éliminer éventuellement du tampon AW2 pouvant toujours demeurer dans l'échantillon après l'étape 8.
10. Placer de nouveau la colonne dans un tube de microcentrifugation stérile de 1,5 ml (non fourni dans le kit) et jeter le filtrat contenu dans l'ancien tube collecteur. Ouvrir prudemment la colonne et ajouter 75 µl du tampon AE (ou eau distillée). Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant 5 min, puis centrifuge à 8.000 rpm (ou 6.000 x g) pendant 1 min.

11. Replacer de nouveau la colonne dans un tube de microcentrifugation stérile de 1,5 ml (non fourni dans le kit) et jeter le filtrat contenu dans l'ancien tube collecteur. Ouvrir prudemment la colonne et ajouter 75 µl du tampon AE (ou eau distillée). Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant 5 min, puis centrifuge à 8.000 rpm (ou 6.000 x g) pendant 1 min.
12. L'ADN extrait obtenue doit être conservé à -20°C pour l'utilisation ultérieure.

Annexe 4 : Protocole de la PCR et de la Digestion Enzymatique

(Traduit de l'anglais au français)

Procédures de la PCR 1^{er} tour

1. Disposer de tous les réactifs hors du réfrigérateur ou du congélateur, à l'exception de la Taq.
2. Arranger les échantillons dans un ordre précis et souhaité et noter la position de chaque échantillon dans le cahier de laboratoire. Ne pas oublier d'inclure un contrôle négatif, un contrôle positif sauvage et un contrôle positif mutant appropriés. Il est important de toujours vérifier au cours de toute la manipulation que l'ordre des échantillons de départ est conservé jusqu'à la fin de la deuxième PCR.
3. Copier la composition du Master Mix dans votre cahier de laboratoire ; multiplier et reporter les quantités correspondant au nombre d'échantillons à analyser pour la même expérience (la composition des Master Mix figure dans le tableau Ia). Pour ce calcul, ajouter au 4 échantillons supplémentaires pour tous les 50 échantillons à analyser. Avant de constituer le Master Mix, s'assurer que les concentrations des stocks sont conformes à celles indiquées dans le tableau Ia ci-après. Dans le cas contraire, il faudra adapter des volumes de dilutions pour respecter les concentrations et les volumes finaux.
4. Placer les échantillons et le cahier de table (de laboratoire) ainsi que tous les réactifs sur une table propre, de préférence sous une hotte.
5. Disposer d'une plaque PCR dans un bloc de glace à proximité.
6. Choisir un tube approprié pour la constitution du Master Mix. Additionner tous les réactifs avant d'y ajouter la Taq en dernière position. Pipeter d'abord l'eau, ensuite les amorces puis le tampon, les dNTP enfin le MgCl₂. Chaque réactif doit être vortexé 1 à 2 secondes avant d'être pipeté. Les amorces doivent être choisies conformément aux indications du tableau IVa ci-dessous.
7. Ajouter la Taq : choisir la pipette appropriée et approcher le Master Mix du congélateur dans lequel la Taq est conservée. Ajouter la Taq et la replacer dans le congélateur. Ramener le Master Mix complet sous la hotte et vortex pendant 2 à 3 secondes.
8. Aliquoter 23 µl du Master Mix dans chaque tube à PCR ou dans chaque puit de la plaque.

9. Soulever la plaque ou les tubes du bloc de glace pour vérifier qu'un aliquot a été placé dans chaque tube ou chaque puit.
10. Ajouter l'ADN extrait à chaque tube ou à chaque puit contenant le Master Mix. Ne rien mettre dans le premier puit qui constitue ainsi le contrôle négatif. Commencer par le contrôle positif. Chaque échantillon doit être vortexé avant d'être additionné au Master Mix.
11. Couvrir chaque puits ou chaque tube puis marquer le nom de la PCR sur la plaque (1^{er} ou 2^{ème} PCR), le nom du gène (DHFR ou DHPS), la page dans le cahier de laboratoire où est décrite la présente expérience et la date de l'expérience.
12. Placer les échantillons ainsi constitués dans la machine d'amplification (thermocycleurs) en respectant les conditions de température décrites dans le protocole (tableau Ia).
13. A la fin de la réaction, stocker les produits obtenus dans un congélateur avant la prochaine utilisation.

Tableau IIIa : Master Mix pour le 1^{er} tour de PCR DHFR 51, 59, 108 et 164 et DHPS 437 et 540

	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en μ L)
H ₂ O	-	-	16,05
Tampon	10X	1X	2,5
dNTP	2 mM	200um	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
Primer 1	10 μ M	0,2 μ M	0,5
Primer 2	10 μ M	0,2 μ M	0,5
Taq	5 U/ μ L (INV)	1 U	0,2
Echantillon	Inconnu	Inconnu	2,0
Volume final			25

Procédures de la PCR 2nd tour

1. Disposer de tous les réactifs hors du réfrigérateur ou du congélateur, à l'exception de la Taq, ainsi que des produits PCR du 1^{er} tour d'amplification.
2. Arranger les échantillons dans un ordre précis et souhaité et noter la position de chaque échantillon dans le cahier de laboratoire. Ne pas oublier d'inclure un contrôle négatif, un contrôle positif sauvage et un contrôle positif mutant appropriés. Il est important de toujours vérifier au cours de toute la manipulation que l'ordre des échantillons de départ est conservé jusqu'à la fin de la deuxième PCR.
3. Copier la composition du Master Mix dans votre cahier de laboratoire ; multiplier et reporter les quantités correspondant au nombre d'échantillons à analyser pour la même expérience (la composition des Master Mix figure dans les tableaux IIa et IIIa). Pour ce calcul, ajouter au 4 échantillons supplémentaires pour tous les 50 échantillons à analyser. Avant de constituer le Master Mix, s'assurer que les concentrations des stocks sont conformes à celles indiquées dans les tableaux IIa et IIIa. Dans le cas contraire, on calcule les volumes de dilutions pour respecter les concentrations et les volumes finaux.
4. Placer les échantillons et le cahier de table (de laboratoire) ainsi que tous les réactifs sur une table propre, de préférence sous une hotte.
5. Disposer d'une plaque PCR dans un bloc de glace à proximité.
6. Choisir un tube approprié pour la constitution du Master Mix. Additionner tous les réactifs avant d'y ajouter la Taq en dernière position. Pipeter d'abord l'eau, ensuite les amorces puis le tampon, les dNTP enfin le MgCl₂. Chaque réactif doit être vortexé 1 à 2 secondes avant d'être pipété. Les amorces doivent être choisies conformément aux indications du Tableau Ia ci-dessous.
7. Ajouter la Taq : choisir la pipette appropriée et approcher le Master Mix du congélateur dans lequel la Taq est conservée. Ajouter la Taq et la replacer dans le congélateur. Ramener le Master Mix complet sous la hotte et vortex pendant 2 à 3 secondes.
8. Aliquoter 48 µl du Master Mix dans chaque tube à PCR ou dans chaque puit de la plaque.
9. Soulever la plaque ou les tubes du bloc de glace pour vérifier qu'un aliquot a été placé dans chaque tube ou chaque puit.

10. Ajouter le produit PCR de 1^{er} tour à chaque tube ou à chaque puit contenant le Master Mix. Ne rien mettre dans le premier puit qui constitue ainsi le contrôle négatif. Commencer par le contrôle positif. Chaque échantillon doit être vortexé avant d'être additionné au Master Mix. On peut utiliser des multicanaux de 0,5 à 10 µl pour prélever soigneusement 2 µl de produit de la 1^{ère} PCR que l'on introduira dans les puits et tubes appropriés.
11. Couvrir chaque puits ou chaque tube puis marquer le nom de la PCR sur la plaque (1^{er} ou 2^{ème} PCR), le nom du gène (DHFR ou DHPS), la page dans le cahier de laboratoire où est décrite la présente expérience et la date de l'expérience.
12. Placer les échantillons ainsi constitués dans la machine d'amplification (thermocycleurs) en respectant les conditions de température décrites dans le protocole (Tableau Ia).
13. A la fin de la réaction, stocker les produits obtenus dans un congélateur avant la prochaine utilisation.

Tableau IVa : Master Mix pour le 2nd tour de PCR DHPS 437 et 540

	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
H2O	-	-	34,3
Tampon	10X	1X	5
dNTP	2 mM	200um	5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
Primer 1	10 µM	0,2 µM	1
Primer 2	10 µM	0,2 µM	1
Taq	5 U/µL (INV)	1 U	0,2
Echantillon	Inconnu	Inconnu	2,0
Volume final			50

Tableau Va : Master Mix pour le 2nd tour de PCR DHFR 51, 59, 108 et 164

	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en μ L)
H2O	-	-	34,3
Tampon	10X	1X	5
dNTP	2 mM	200um	5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
Primer 1	10 μ M	0,2 μ M	1
Primer 2	10 μ M	0,2 μ M	1
Taq	5 U/ μ L (INV)	1 U	0,2
Echantillon	Inconnu	Inconnu	2,0
Volume final			50

Procédures de réalisation de la réaction de digestion enzymatique

1. Disposer de tous les réactifs nécessaires pour la digestion enzymatique hors du réfrigérateur ou du congélateur pour les décongeler y compris les enzymes que l'on gardera sur de la glace.
2. NB : on pourrait envisager de lancer la réaction de digestion de DHPS 437 et DHPS 540 en même temps car ce sont les mêmes conditions de température. Dans ce cas, on fera sortir simultanément les réactifs correspondant aux 2 types de digestion enzymatique. Deux Master Mix seront préparés. Bien s'assurer d'un bon étiquetage des tubes ou des plaques pour ne pas créer une confusion au cours de la manipulation.
3. Arranger les échantillons dans un ordre précis et souhaité et noter la position de chaque échantillon dans le cahier de laboratoire. Ne pas oublier d'inclure un contrôle négatif, un contrôle positif sauvage et un contrôle positif mutant appropriés. Il est important de toujours vérifier au cours de toute la manipulation que l'ordre des échantillons de départ est conservé jusqu'à la fin de la migration sur gel.
4. Copier la composition du Master Mix dans votre cahier de laboratoire ; multiplier et reporter les quantités correspondant au nombre d'échantillons à analyser pour la même expérience (la composition des Master Mix figure dans le Tableau Va). Pour ce calcul, ajouter au 4 échantillons supplémentaires pour tous les 50 échantillons à analyser. Avant de constituer le Master Mix, s'assurer que les concentrations des stocks sont conformes à celles indiquées dans le Tableau Va. Dans le cas contraire, il faudra adapter les quantités de dilutions pour respecter les concentrations et les volumes finaux.
5. Placer les échantillons et le cahier de table (de laboratoire) ainsi que tous les réactifs sur une table propre, de préférence sous une hotte.
6. Disposer d'une plaque PCR dans un bloc de glace à proximité.
7. Choisir un tube approprié pour la constitution du Master Mix. Pipeter d'abord l'eau. En dehors des enzymes, chaque réactif doit être vortexé 1 à 2 secondes avant d'être pipeté.
8. Aliquoter 10 µl du Master Mix dans chaque tube à PCR ou dans chaque puit de la plaque.

9. Soulever la plaque ou les tubes du bloc de glace pour vérifier qu'un aliquot a été placé dans chaque tube ou chaque puit.
10. Ajouter le produit de la 2^{nde} PCR à chaque tube ou à chaque puit ou tube contenant le Master Mix. On peut aussi utiliser les multicanaux. Respecter l'ordre décrit dans le cahier de laboratoire.
11. Couvrir chaque puits ou chaque tube puis marquer le nom de la réaction (digestion enzymatique), le nom du gène (DHFR ou DHPS), la page dans le cahier de laboratoire où est décrite la présente expérience et la date de l'expérience.
12. Une brève centrifugation (1000rpm) est nécessaire pour faire disparaître les bulles éventuellement formées.
13. Placer les échantillons dans un incubateur à 37°C pendant 2 heures pour les gènes DHFR 59 ou DHPS 437 et 540, à 65°C pendant 1 à 2 heures pour DHFR 51, 108 et 164.
14. Placer les échantillons ainsi constitués dans la machine d'amplification (thermocycleurs) en respectant les conditions de température décrites dans le protocole (Tableau Ia).
15. A la fin de la réaction, stocker les produits obtenus dans un congélateur avant la prochaine étape.

Tableau VIa : Digestion enzymatique avec des enzymes de restriction

DHFR 51 (65° C for 2 heures)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
Tsp 509I	10 U/uL (NEB)	7 U	0,7
Neb1	10X	1X	2,0
H2O	-	-	7,3
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0
DHFR 59 (37° C for 2 heures)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
XmnI	20 U/uL (NEB)	6 U	0,3
Neb2	10X	1X	2,0
BSA	100X	1X	0,2
H2O	-	-	7,5
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0
DHFR 108 (65° C for 2 hours)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
BsrI	5 U/uL (NEB)	6 U	1,2
Neb3	10X	1X	2,0
H2O	-	-	6,8
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0
DHFR 164 (37° C for 2 heures)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
DraI	20 U/uL (NEB)	10 U	0,5
Neb4	10X	1X	2,0
H2O	-	-	7,5
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0
DHPS 437 (37° C for 2 heures)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
AvaII	10 U/uL (NEB)	20 U	2,0
Neb4	10X	1X	2,0
H2O	-	-	6,0
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0
DHPS 540 (37° C for 2 heures)			
	Concentration du Stock	Concentration Finale	Volume (en µL)
Fok I	4 U/uL (NEB)	2 U	0,5
Neb4	10X	1X	2,0
H2O	-	-	7,5
Echantillon	Inconnu	Inconnu	10,0
Volume final			20,0

Procédure pour la migration par électrophorèse sur gel d'agarose sur gel d'agarose

1. Disposer de tous les réactifs nécessaires (colorant tampon de chargement 6X, un marqueur de poids moléculaire pour 50 pb) et des échantillons de produits PCR obtenus après la digestion enzymatique. Disposer de gel déjà préparés et près à l'utilisation. Nous avons utilisé du gel d'agarose à 2,5% (voir préparation plus bas). Préparer aussi une plaque ou des tubes dans de la glace.
2. Vérifier la présence du TBE dans la cuve d'électrophorèse. Le TBE doit être changé après toutes les 5 migrations sur gel. On doit avoir un système de numérotation sur les cuves d'électrophorèse elles-mêmes. Les cuves d'électrophorèse pour la migration doivent rester fermes après l'utilisation.
3. Couper un morceau de paraffine et déposer à côté de la cuve.
4. Noter le plan et l'ordre des échantillons à faire migrer dans le cahier de laboratoire.
5. D'abord déposer des gouttes de 5 µl de tampon colorant de charge sur le morceau de paraffine en nombre suffisant pour chaque puit sur le gel.
6. Ensuite déposer 15-20 µl de produit de PCR de la digestion sur chaque goutte de colorant. Toujours respecter sur le gel l'ordre des échantillons décrit dans le cahier.
7. Placer le gel dans la cuve avant de commencer à déposer les échantillons avec le colorant de charge au fond de chaque puit. En général, il faut sauter le premier puit dans lequel sera introduit le marqueur de poids moléculaire.
8. Introduire 15-20 µl du marqueur de poids moléculaire.
9. Actionner la machine pour la circulation électrique à 80-90 volts. Le gel peut être retiré dès que le colorant aura migré jusqu'à la moitié du gel. Cela prend généralement 1h et ½ à 2h de temps.
10. Enlever alors le gel de la cuve et le placer sous un diaphanoscope (rayons UV, 312 nm) surmonté d'une caméra connectée à un moniteur pouvant imprimer des photos. La caméra peut être connectée à un ordinateur. S'assurer de bien connaître la manipulation de cet appareillage.

11. Vérifier la netteté de l'image puis imprimer une image. Vérifier la place du marqueur de poids moléculaire. Interpréter en tenant compte des bandes présentes sur le marqueur de poids de poids moléculaire. On devra s'aider des consignes décrites par le fabricant du marqueur de poids moléculaire pour la détermination des tailles des bandes.

12. **NB :**

- L'interprétation est meilleure lorsque les images sont transmises sur une caméra. Dans notre cas, nous avons fait l'interprétation sur des photos. Un échantillon correspondant à une souche sauvage présente uniquement les bandes correspondant à celles décrites pour le type sauvage (voir tableau VIIa). Tout échantillon chez qui on a retrouvé soit uniquement les bandes du type mutant, soit à la fois les bandes de type sauvage et celles de type mutant, a été déclaré mutant. Toutes les tailles de bandes (en pair de bases) recherchées par point de mutation, que ce soit pour les types sauvages ou mutants sont présentées dans le tableau VIIa.
- Toute l'expérience a été déclarée valide lorsque les contrôles positifs sauvage et mutant étaient effectivement positifs et le contrôle négatif était effectivement vérifié négatif. Dans le cas contraire, il a fallu reprendre la PCR.

Tableau VIIa : Contrôles des PCR et tailles des fragments attendus

Gene	Contrôles sauvages	Contrôles Mutants	Fragments Sauvages (bp)	Fragments Mutants (bp)
DHFR 108	3D7 ou FCR3	V1/S	522	190, 332
DHFR 51	3D7 ou FCR3	V1/S	5,10,46,55,63,65,120,139	5,10,46,55,65,120,202
DHFR 59	3D7 ou FCR3	V1/S	142, 184	22, 142, 162
DHFR 164	3D7 ou FCR3	V1/S	107, 171, 245	28, 107, 143, 245
DHPS 437	Mali ou FCR3	Peru	438	34, 404
DHPS 540	Mali ou FCR3	Peru	7, 19, 412	7, 19, 99, 313

Préparation du gel

1. Préparation de TBE 5X :

Pour 1 litre de solution de stock

- 54g de tris base
- 27,5g d'acide borique
- 20 mL de 0,5 M de l'EDTA à pH= 8

2. Préparation de gel

Pour 2 gels :

- 5g agarose
- 200 mL TBE 1X
- 15 uL de bromide d'éthidium
- Chauffer dans un four à micro-onde pendant 4 ½ minutes pour 2 gels (6 minutes for 4 gels)
- Ensuite laisser refroidir jusqu'à environ 60° C et ajouter le bromide d'éthidium

3. Préparation du bleu de charge (colorant)

- 25 mg (0,25%) de cyanole de xylène
- 3 mL (30%) de glycerol
- 7 mL de H2O.

4. Préparation du marqueur de poids moléculaire (1 ml)

- 50 uL de stock de marqueur (50bp ladder)
- 170 uL du bleu de charge de bromophénol 6X
- 780 uL de H2O pour compléter à 1 ml.