

**REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE**

*Union – Discipline - Travail*

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**UFR DES SCIENCES MEDICALES**

Année : 1998-1999

**MEMOIRE**

Pour l'obtention du

**DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES  
BIOLOGIE HUMAINE TROPICALE**

**Option : Parasitologie**

**ETUDE MOLECULAIRE DES MUTATIONS DU  
CODON 108 DU GENE DHFR DE 64 ISOLATS DE  
*PLASMODIUM FALCIPARUM* D'ENFANTS MALADES  
A BOBO-DIOULASSO**

Présenté par :

**Docteur Sheick Oumar COULIBALY**

**Directeur de mémoire : Pr. KONE Moussa  
Co-Directeur : Pr. GUIGUEMDE T. Robert**

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis d'exécuter ce travail et particulièrement

Au Professeur KONE Moussa, qui a accepté de diriger ce mémoire et qui m'a assisté tout le long du parcours;

Au Professeur GUIGUEMDE T. Robert dont l'assistance constante m'a été fort utile ;

Au Professeur SESS E. Daniel dont la compréhension et la disponibilité m'a permis d'aboutir à ce mémoire;

Aux professeurs M. DOSSO et H. FAYE-KETTE pour leur soutien et leurs conseils qui se sont avérés si indispensables;

Au Docteur Philippe VAN DE PERRE , Directeur du Centre Muraz pour son soutien et ses encouragements ;

A tout le personnel du laboratoire de Parasitologie-Entomologie du Centre Muraz pour son soutien et son assistance.

# SOMMAIRE

## PAGES

<b>INTRODUCTION</b> -----	1
<b>I.GENERALITES</b> -----	3
<b>I.1 <i>Plasmodium falciparum</i></b> -----	3
I.1.1 Définition -----	3
I.1.2 Taxonomie -----	3
I.1.3 Biologie -----	5
I.1.4 Le Paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> -----	10
I.1.5 Médicaments antipalustres et Résistances de <i>P.falciparum</i> -	12
<b>I.2 La DHFR et le gène DHFR</b> -----	14
<b>II. OBJECTIFS</b> -----	17
<b>II.1 OBJECTIF GENERAL</b> -----	17
<b>II.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES</b> -----	17
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b> -----	18
<b>III. 1 MATERIEL</b> -----	18
<b>III.2 METHODES</b> -----	19
<b>III.2.1. Réactifs</b> -----	19
III. 2.1.1 Réactifs pour l'extraction de l'ADN plasmodial --	19
III. 2.1.2 Réactifs pour la PCR -----	19
III. 2.1.3 Réactifs pour la digestion enzymatique -----	20
III. 2.1.4 Réactifs pour la migration, et la révélation ----	21
<b>III.2.2 Les instruments</b> -----	21

III.2.3. Protocoles -----	21
III.2.3.1. Extraction de l'ADN plasmodial -----	22
III.2.3.2. Première PCR : Amplification du gène DHFR --	23
III.2.3.3. Deuxième PCR : Amplification mutation-dépendante	24
III.2.3.4. Digestion avec les endonucléases -----	27
III.3 GESTION ET ANALYSE DES DONNEES -----	29
<b>IV. RESULTATS -----</b>	<b>30</b>
IV.1 RESULTATS GENERAUX -----	30
IV. 1.1. Résultats de l'amplification du gène DHFR -----	30
IV. 1.2. Résultats de l'amplification mutation-dépendante -----	32
IV. 1.3. Résultats de la digestion enzymatique -----	34
IV.2 RESULTATS ANALYTIQUES -----	37
IV. 2.1. Résultats de l'amplification du gène DHFR -----	37
IV. 2.2. Résultats de l'amplification mutation-dépendante -----	38
IV. 1.3. Résultats de la digestion enzymatique -----	40
IV.3 RESULTATS COMPARATIFS DES DEUX METHODES -----	42
<b>V . COMMENTAIRES ET DISCUSSION -----</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSION -----</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>RESUME</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Asn :	Asparagine
CAMEG :	Centrale d'Achat de Médicaments Essentiels Génériques
CNLP :	Centre National de Lutte contre le Paludisme
DHFR :	Dihydrofolate reductase
DHPS :	Dihydroptéroate-synthétase
DNTP :	Désoxyribonucléotides triphosphate
GE :	Goutte épaisse
GRP/mm <sup>3</sup> :	Globules Rouges Parasités par mm <sup>3</sup> de sang
MgCl <sub>2</sub> :	Chlorure de Magnésium
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PABA :	Acide para-amino-benzoïque
Pb :	paires de bases
PBS :	Phosphate-buffered saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
[Prog] <sup>R</sup> :	phénotype Proguanil-résistant
[Pyr] <sup>R</sup> :	phénotype Pyriméthamine-résistant
[S] :	phénotype Sensible
Ser :	Sérine
Taq Pol. :	Taq polymérase
TBE :	Acide Tris Borique EDTA
Thr :	Thréonine
TS :	Thymidilate synthétase
UV :	Lumière ultra violette

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### TABLEAUX :

	<u>PAGES</u>
Tableau I : Amorces de la 2 <sup>ème</sup> PCR suivant les caractéristiques moléculaires de résistance aux antifoliques-----	25
Tableau II : Endonucléases suivant les caractéristiques moléculaires de résistance aux antifoliques-----	27
Tableau III : Mode de préparation des échantillons pour la digestion enzymatique -----	28
Tableau IV : Résultats de l'amplification du gène DHFR de 174 prélèvements-----	30
Tableau V : Résultats globaux de l'amplification mutation-dépendante de 192 isolats [DHFR+]-----	32
Tableau VI : Résultats globaux de la digestion enzymatique de 192 isolats [DHFR+]-----	34
Tableau VII : Corrélation des résultats de la PCR DHFR et de la GE par jeu de confetti-----	37
Tableau VIII : Associations des phénotypes de sous-populations selon les résultats de la PCR mutation-dépendante-----	38
Tableau IX : Associations des phénotypes de sous-populations selon les résultats de la digestion enzymatique -----	40
Tableau X : tableau comparatif des résultats selon les deux méthodes -	42

## FIGURES :

Figure n°1 : Cycle évolutif de <i>Plasmodium falciparum</i> -----	3
Figure n°2 : Représentation simplifiée du métabolisme des folates chez les plasmodies -----	16
Figure n°3 : Photographie de gel de révélation du gène DHFR -----	31
Figure n°4 : Photographie de gel de la 2 <sup>ème</sup> PCR -----	33
Figure n°5 : Photographie de gel de produits de la digestion enzymatique -	35

## INTRODUCTION

Le paludisme demeure l'endémie la plus meurtrière en Afrique malgré l'apparition et l'extension dramatique du SIDA (36). La morbidité palustre constitue un véritable frein au développement économique des pays endémiques qui sont déjà les plus pauvres au monde. La mortalité due au paludisme est importante et atteint surtout les enfants en bas âge. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, il survient entre 300 et 500 millions d'épisodes morbides et au moins 1 million de décès (principalement parmi les enfants de 0 à 5 ans) dus au Paludisme (36).

Une des principales stratégies pour le contrôle de cette maladie est le traitement des cas, ce qui suppose l'existence et la disponibilité de médicaments efficaces. De nombreux médicaments de classes et de modes d'action différents ont été développés. Mais très rapidement des résistances à ces molécules sont apparues, entravant sérieusement la lutte contre la maladie. Une plus forte mortalité serait liée à l'émergence de la chloroquino-chimiorésistance (35). La Sulfadoxine-Pyriméthamine qui est pour plusieurs pays le médicament de deuxième intention dans le traitement du paludisme simple est encore efficace dans plusieurs pays de l'Afrique de l'ouest (18). Mais il est connu que la résistance à ce médicament apparaît et se développe rapidement, aidée en cela par la pression médicamenteuse.

A nos jours, seules deux méthodes fiables permettent de mesurer l'efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine. Il s'agit du test d'efficacité thérapeutique (test *in vivo*) et de la détection par des méthodes de biologie moléculaire des mutations du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* conférant la résistance à la pyriméthamine et au proguanil/cycloguanil (9, 29, 33, 43, 24, 2, 5, 28, 39). La sulfadoxine-pyriméthamine n'est pas adaptée au test *in vitro* généralement utilisé pour les autres médicaments antipalustres.



Tandis que le premier type de test reflète la réalité clinique à travers l'efficacité thérapeutique, le second met en évidence la capacité intrinsèque du parasite à résister au médicament. Comme le test *in vitro*, les tests géniques permettent de prévoir la survenue et les variations de l'importance de la résistance dans une région endémique donnée.

Nous nous proposons d'étudier les mutations du gène DHFR de 64 isolats de *Plasmodium falciparum* provenant de 56 enfants malades (1-14 ans) et soumis au test d'efficacité thérapeutique de la Sulfadoxine-Pyriméthamine (FANSIDAR®) à Bobo-Dioulasso (BURKINA FASO).

# GENERALITES

# **I. GENERALITES**

## **I.1 Plasmodium falciparum**

### **I.1.1 Définition**

*Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus pathogène et la plus répandue des agents du paludisme humain. Il appartient à la famille des *plasmodiidae* ou plasmodies, protozoaires appartenant à l'embranchement des *sporozoaires* et à l'ordre des *Haemosporididae*. Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement de leur cycle : un vertébré, hôte intermédiaire hébergeant la multiplication asexuée ou schizogonie du parasite et un invertébré : le moustique du genre *Anopheles*, hôte définitif chez lequel s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonie (figure n°1 cycle évolutif). Près de 120 espèces de plasmodies ont été décrites dont trois sont spécifiquement humaines, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, et *P. ovale*. Une espèce est commune à l'Homme et aux grands singes africains : *P. malariae*.

### **I.1.2 Taxonomie**

La famille des *plasmodiidae* comprend le seul genre *Plasmodium* qui est divisé en plusieurs sous-genres. Le schéma taxonomique des plasmodies le plus utilisé est celui proposé par Garham en 1966 (40). Il classe cette famille en 9 sous-genres. Trois sous-genres comprennent les plasmodies des mammifères, quatre celles des oiseaux et deux celles des reptiles. Certains genres trouvent leur homologue dans un autre sous-genre. C'est le cas de *Plasmodium malariae* de l'Homme qui a pour équivalent aviaire *Plasmodium gallinaceum* des oiseaux ou de *Plasmodium falciparum* humain avec le genre *Vinckeia* des rongeurs.

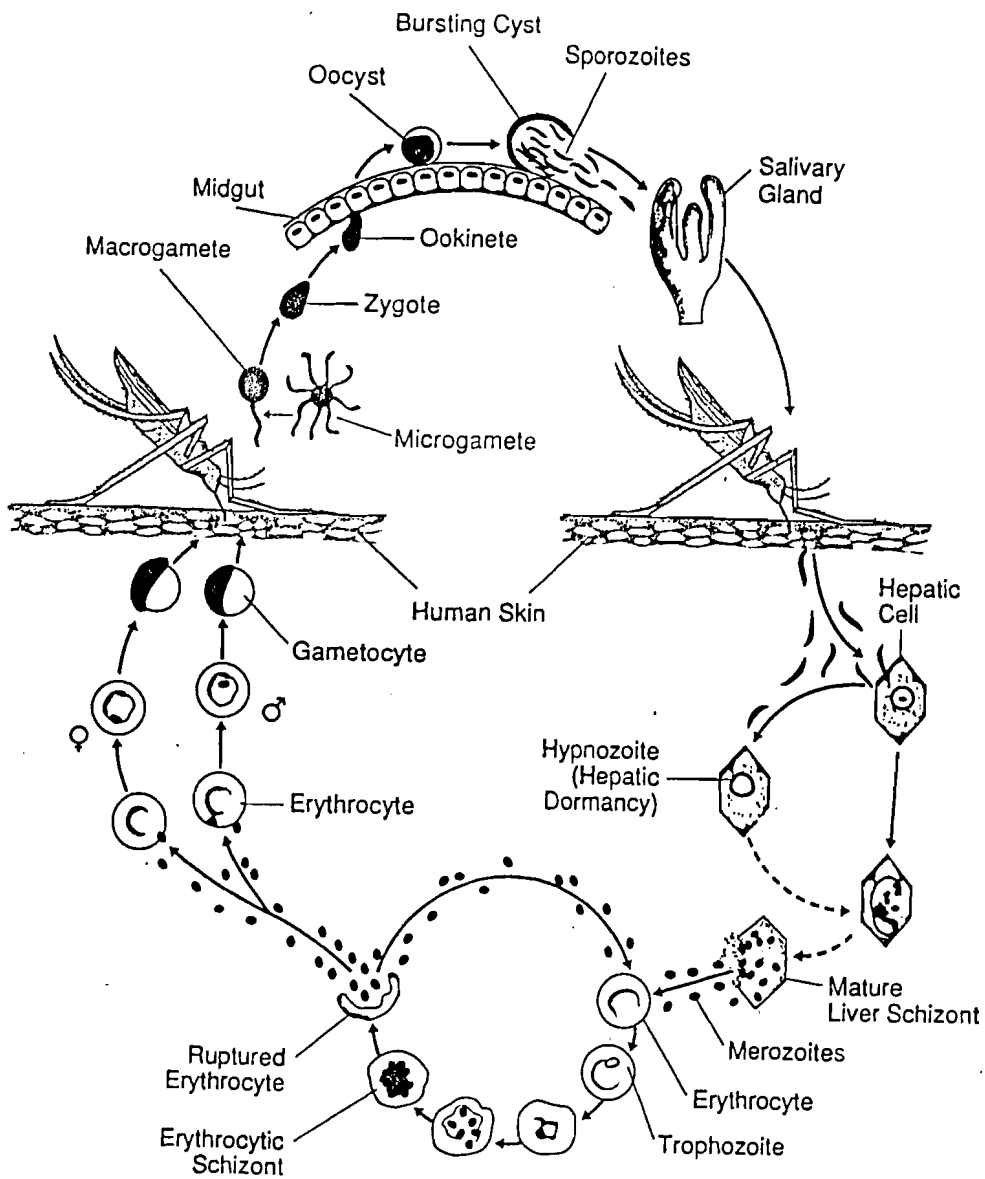


Figure n°1 : Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum*  
(extrait de GILLES and WARRELL Bruce-Chwatt's essential  
malariaology 1993)

Il existe de profondes différences entre les sous genres de mammifères, oiseaux et reptiles. Des différences moins marquées existent également entre les espèces d'un même sous-genre.

Les différences entre sous genres portent principalement sur la nature de l'hôte, les caractéristiques de la schizogonie (durée, site anatomique des stades évolutifs, etc...) et l'issue de l'infestation.

Les différences entre les 3 sous-genres des mammifères (*Plasmodium* ou *Laverania* des primates, et de l'Homme et *Vinckeia* des rongeurs) portent essentiellement sur la nature de l'hôte, la morphologie et l'ultrastructure des stades évolutifs, le site tissulaire de ces stades et la période pré-patente.

La gravité clinique liée à l'infestation par *P. falciparum* a souvent été attribuée à l'origine récente de cette espèce et à son caractère de parasite imparfait (11). Des études ultrastructurales des stades sporogoniques ont montré que *P. falciparum* était plus proche des espèces aviaires ou murines que des autres plasmodies humaines. L'étude du contenu en déoxyguanosine-déoxycytosine (G-C) de l'ADN de différentes plasmodies tend à confirmer ce résultat.

### I.1.3 Biologie

Les plasmodies ont un cycle évolutif comprenant une phase sexuée (sporogonie) faite d'une fécondation des gamètes suivie d'une multiplication dans l'estomac puis les glandes salivaires de l'anophèle et une phase asexuée (schizogonie) avec multiplication chez l'hôte vertébré. Cette dernière phase comporte un cycle hépatique et un cycle érythrocytaire. Tout le long de son cycle le parasite évolue en une douzaine de stades environ (11) (fig. n°1).

**L'infestation de l'Homme** a lieu au cours de la piqûre d'un anophèle femelle infesté. Les *sporozoïtes* localisés dans les glandes salivaires du vecteur sont déversés dans les capillaires sanguins cutanés. Ces éléments filiformes de

quelques microns de long se répartissent dans l'organisme et gagnent électivement le foie dont ils envahissent les cellules.

La **phase hépatique** du cycle est silencieuse. Dans l'hépatocyte le *sporozoïte* s'arrondit et devient un *trophozoïte*, élément de quelques microns de diamètre, uninucléé. Certains trophozoïtes évoluent immédiatement jusqu'à la maturité et d'autres (spécifiquement ceux de *P. ovale* et *P. vivax*) restent sous forme uninucléée dormante, l'*hypnozoïte*. Au cours de cette schizogonie hépatique le *trophozoïte* se développe et se divise, donnant en une à trois semaines un *schizonte* mature, volumineuse cellule (40-100  $\mu\text{m}$ ) contenant quelques milliers de noyaux. Arrivé à maturité (corps bleu) il éclate libérant des *mérozoïtes*, formes uninucléées qui initieront la phase érythrocytaire. Les *hypnozoïtes* ont la capacité de reprendre à un moment donné la suite de l'évolution et de provoquer alors des rechutes.

La **phase érythrocytaire** commence par la pénétration active du *mérozoïte* dans le globule rouge. Il se transforme alors en une forme en anneau caractéristique, le *trophozoïte*. Ce dernier se nourrit de l'hémoglobine globulaire dont les produits de dégradation, pigment malarique ou hémozoïne remplissent progressivement la vacuole nutritive parasitaire. La réplication de l'ADN et la multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique donnera naissance à un *schizonte* mûr ou corps en rosace. A maturité le *schizonte* éclate et les *mérozoïtes* libérés envahissent immédiatement de nouvelles hématies, initiant de nouveaux cycles érythrocytaires. La durée de ces cycles varie en fonction de l'espèce plasmodiale : 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* et 72 heures pour *P. malariae*. L'éclatement des rosaces libèrent également l'hémozoïne et les débris globulaires et des substances pyrogènes à l'origine des accès fébriles.

La phase sexuée ou sporogonique débute après plusieurs cycles asexués schizogoniques par l'apparition des *gamétocytes* mâles et femelles, éléments uninucléés. Les *gamétocytes* proviennent de la différenciation de certains parasites érythrocytaires par un stimulus de nature inconnue.

Le moustique est le siège du cycle sexué ou sporogonique entamé par l'apparition de *gamétocytes* dans le sang périphérique de l'Homme. C'est précisément la femelle de certaines espèces d'anophèles, moustiques *Culicidés* de la sous-famille des *Anophélinés* qui est concernée. Il est décrit plus de 400 espèces d'anophèles dans le monde mais seule une soixantaine d'entre elles sont des vecteurs importants du paludisme dans les conditions naturelles.

En prenant son repas sanguin sur un sujet infesté, le moustique absorbe les différents stades du parasite. Les éléments asexués, *trophozoïtes* et *schizontes* sont digérés. Seuls les *gamétocytes* poursuivront leur développement. Le *gamétocyte* femelle se transforme en *macrogamète* et le *gamétocyte* mâle en 8 *microgamètes* flagellé d'environ 20  $\mu\text{m}$ , très mobiles allant à la rencontre du *macrogamète*. La fécondation donne naissance à l'*ookinète*, œuf mobile qui traverse la paroi de l'estomac, formant sur sa face externe l'*ocyste* dans lequel s'individualisent les *sporozoïtes*. Libérés par éclatement de l'*ocyste* mûr, les *sporozoïtes* gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle. La durée de ce cycle varie de 10 à 40 jours, fonction de facteurs tels que la température ou l'espèce plasmodiale.

*P. falciparum*, espèce la plus redoutable car responsable des formes graves et mortelles du paludisme est aussi la plus largement répandue. Sa phase hépatique dure 6 jours et se caractérise par l'absence d'*hypnozoïte*, ce qui explique qu'il n'y ait pas de reviviscence schizogonique pour le paludisme à *P. falciparum*.

L'incubation dure en moyenne 12 jours. *P. falciparum* détermine la fièvre tierce maligne. Une des explications est que la shizogonie érythrocytaire s'effectue

presqu'exclusivement dans les capillaires viscéraux, notamment encéphaliques, où les érythrocytes infestés sont séquestrés du fait de leur adhérence à l'endothélium. Les *gamétocytes* n'apparaissent jamais avant le 10<sup>ème</sup> jour de parasitémie, contrairement aux autres espèces.

Dans l'hématie infestée le parasite se nourrit directement de la partie fluide du cytosol à travers une organelle, le cytostome. Chez *P. falciparum*, le cytosol ingéré est exposé à un ensemble d'enzymes digestives. La digestion de l'hémoglobine est essentielle à la survie du parasite mais n'est pas complète et génère beaucoup de résidus constituant le pigment malarique. Par ailleurs certains nutriments lui parviennent du plasma à travers la cellule hôte dont la perméabilité membranaire a augmenté du fait de l'infestation. L'énergie parasitaire est tirée du lactate obtenu par phosphorylation du glucose. La synthèse protéique et celle des lipides se font avec les acides aminés et des composants plasmatiques. Cependant certains autres besoins parasites ne sont que peu couverts par l'apport direct de l'hôte. C'est le cas des folates qui sont indispensables à la synthèse des acides nucléiques et que le parasite est obligé de synthétiser *de novo* à partir de l'acide para-amino-benzoïque ou PABA (22).

Une diversité génétique considérable a été décrite au sein des populations plasmodiales. Cette hétérogénéité reflète l'extrême 'plasticité' du génome de *P.falciparum* et est la majeure raison de l'aptitude du parasite à échapper à la réponse immune de l'hôte. En outre la diversité génétique a été observée dans la chimiorésistance, les modèles d'iso-enzymes, la morphologie, le caryotype et le répertoire antigénique de l'hôte.

Les études de ces dernières années ont mis en évidence la vaste panoplie antigénique du parasite, qui présente au cours de son cycle biologique un grand nombre d'antigènes différents et de surcroît polymorphes. Certains de ces



antigènes possèdent des motifs proches, constituant un réseau serré de réactions immunologiques croisées.

Les antigènes plasmodiaux peuvent être classés selon leur localisation en :

- antigènes de surface du mérozoïte . C'est le cas des *Merozoïte surface protein* ou MSP 1 et 2. Ils sont ancrés dans la surface du mérozoïte, polymorphes, et sont immunogènes ;
- antigènes associés à la surface du globule rouge. Ce sont des antigènes parasitaires exprimés à la surface de l'hématie. Le plus connu est le *Histidine Rich Protein II* ou HRP II. Ce type d'antigènes est impliqué dans l'agglutination des schizontes, la liaison à l'endothélium vasculaire et la formation de rosettes avec les érythrocytes sains ;
- Les antigènes intervenant dans l'invasion du globule rouge. Leur présence est indispensable à la pénétration du parasite. Ainsi l'antigène Duffy (constitutionnellement absent chez les sujets de race noire) est le récepteur de *P.vivax*.

De nombreux autres antigènes ont été décrits, parfois sous des noms différents. Ils ont des caractéristiques différentes et certains se révèlent être des modèles vaccinaux intéressants. C'est le cas de :

- la *Circumsporozoïte Protein* ou CSP qui est l'antigène le plus représentatif de ce stade parasitaire ;
- du Pf 155/RESA (*Plasmodium falciparum Red Erythrocyte Surface Antigen*), antigène apparaissant à la surface de l'érythrocyte infesté et à l'origine du phénomène de cyto-adhérence dans les micro-vaisseaux ;
- et des *Merozoïte Surface Protein-1,2, et 3* (MSP-1,2, et 3).

### I.1.4 Le paludisme à *P.falciparum*

Le paludisme humain, résultant de l'infection par les plasmodies est une maladie très répandue dans le monde. Il est transmis à l'Homme par la piqûre de l'anophèle femelle qui en est l'hôte définitif. Le paludisme sévit sous forme d'endémie et/ou d'épidémie sur toute la zone tropicale du globe correspondant à la répartition géographique de ses vecteurs.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 2,5 milliards de personnes (40% de la population mondiale) sont exposées au risque palustre dans le monde : Afrique, Amérique du sud, et Asie. 300 à 500 millions de personnes souffriraient chaque année de cette maladie qui provoque environ entre 1,5 et 2,7 millions de décès par an (41). Selon la même source 90% des cas et des décès surviennent en Afrique essentiellement dans sa partie subsaharienne ou un enfant sur vingt (1/20) meurt de cette maladie.

En Afrique le paludisme à *P.falciparum* est la forme la plus répandue et constitue un véritable fléau par la morbidité et la mortalité qu'il engendre (41). C'est la forme de paludisme qui tue. Par contre *P.malariae* et *P.ovale* sont plus rares, cliniquement moins dangereux et plus accessibles au traitement. Quant à *P.vivax*, il n'infeste pas le sujet de race noire.

Les jeunes enfants et particulièrement ceux de moins de 5 ans, du fait de l'immaturité de leur système immunitaire sont exposés aux formes les plus graves et les plus mortelles: paludisme neurologique, anémie, insuffisance rénale, oedème aigu du poumon, etc...(41).

La survenue du paludisme au cours de la grossesse est à l'origine d'avortements ou d'accouchements prématurés, d'anémie et de mort maternelle, de petits poids de naissance et de paludisme congénital (41).

Au Burkina Faso, le paludisme constitue le premier motif de consultation et la première cause d'hospitalisation et de décès dans les services de santé (25). On estime que chaque enfant présente au moins un accès palustre par an (6) et que

la mortalité liée au paludisme est très élevée. La mortalité palustre hospitalière peut atteindre 45% (25).

Il est en outre responsable d'importantes pertes économiques (10, 12).

L'importance de ce problème de santé publique a conduit à l'élaboration d'un Programme National de Lutte contre le paludisme en 1993. Ce programme est structuré autour de stratégies essentielles dont la prise en charge correcte des cas à tous les niveaux du système de santé et au niveau communautaire. La Chloroquine y est désignée comme le médicament de choix pour le traitement de l'accès palustre simple, suivi de la Sulfadoxine-Pyriméthamine. La Quinine y est préconisée pour le traitement des cas graves. Par ailleurs le programme relève la surveillance de la chimiorésistance comme élément indispensable à une meilleure adaptation de l'arsenal thérapeutique à la situation épidémiologique du paludisme.

Bien qu'il existe 3 faciès épidémiologiques du paludisme en rapport avec l'importance des précipitations et la transmission, ce programme ne connaît pas de restriction dans son champ d'application.

La région de Bobo-Dioulasso, située dans le sud-ouest du pays est une zone de savane tropicale. La transmission du paludisme y est faible à modérée en milieu urbain et sub-urbain (32) et saisonnière avec une recrudescence hivernale en rapport avec la pillulation anophélienne (Juin-Novembre). Les principaux vecteurs sont *Anopheles gambiae s.l* et *Anopheles funestus*.

### I.1.5 Médicaments antipalustres et Résistance de *Plasmodium falciparum*

Il existe de nombreux médicaments antipalustres classés diversement selon l'origine naturelle ou synthétique, la famille chimique, le mode d'action, etc...

Beaucoup de ces médicaments qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique ont fait la preuve de leur efficacité sur les plasmodies infestant l'Homme. Ainsi la Quinine extraite du Quinquina a servi pendant plusieurs siècles pour traiter les accès de paludisme et même les prévenir.

Pendant les années 1940 de nombreux antipaludiques synthétiques parmi lesquels la Chloroquine (CQ), la Pyriméthamine, la Dapsone ont été découverts. Parmi ces molécules la Chloroquine est celle qui fût le plus largement utilisé compte tenu d'une bonne efficacité alliée à peu d'effets secondaires. Son faible coût faisait d'elle le médicament de choix pour le programme d'éradication du paludisme entamé par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1957. Cependant dès 1959 la Chloroquine a perdu de son efficacité progressivement en Asie et en Amérique par apparition de souches résistantes(4). Le phénomène se répandra à partir de ces points focaux au reste du monde. La chloroquino-résistance atteindra le continent africain en 1978 par sa côte Est. Dans la décennie qui a suivi, pratiquement tout le continent était atteint par le phénomène (7).

La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est une association synergique de deux molécules antifoliques agissant à deux niveaux sur la chaîne de synthèse des acides nucléiques du parasite. Elle se présente sous forme de comprimés (500 mg de sulfadoxine + 25 mg de pyriméthamine) ou de solution injectable intramusculaire (400 mg de sulfadoxine + 20 mg de pyriméthamine). Son administration se fait en dose unique.

La SP fût introduite au début des années 1960 à la faveur de la 're-découverte' de l'activité antiplasmodiale des sulfones et sulfonamides. Cette combinaison a

surtout visé à traiter les cas de paludisme chloroquino-résistant et à assurer la chimioprophylaxie compte tenu de la longue demi-vie de ses composants (120-220 heures) (16).

La résistance de *Plasmodium falciparum* à l'association Sulfadoxine-Pyriméthamine ne serait pas un phénomène expansif comme celui de la chloroquino-résistance (16). Elle est apparue simultanément au cours des années 1980 dans des régions géographiques différentes (Asie du sud-est, Indonésie, Amazonie) où ce médicament fût fortement utilisé suite à l'apparition de la chloroquino-résistance. Dans de nombreux pays africains endémiques du paludisme la SP est utilisée comme médicament de deuxième ligne de traitement de l'accès palustre simple. Et l'apparition de résistance à ce médicament constituerait un danger réel vu le faible répertoire d'antimalariques disponibles et le coût élevé des nouveaux produits.

Au Burkina Faso la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) est désignée comme médicament de deuxième ligne depuis 1993 par le PNL. La forme comprimés (3 comprimés par conditionnement) en générique ou spécialité et la forme injectable en spécialité sont commercialisées. Elle est en vente libre dans les pharmacies et dépôts pharmaceutiques privés et publics. Plus de 720.000 comprimés de ce médicament ont été vendus par la CAMEG en 1998 (données CAMEG, non publiées). Ce qui équivaldrait à environ un traitement annuel (dose adulte) par la forme comprimé générique pour 16 personnes. La consommation de ce médicament est loin d'être négligeable quand on sait qu'il faut ajouter à ce chiffre les quantités vendues par d'autres centrales de médicaments sous l'une ou l'autre forme. La résistance à la Pyriméthamine s'installant rapidement sous la pression médicamenteuse, il est à craindre que le phénomène ne s'installe et ne prenne de l'ampleur.

Cependant l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la SP par le test de 14 jours de l'OMS révèle des taux d'échecs thérapeutiques bas dans le pays (8, 17,

14, 18). Cette méthode consiste à soumettre des enfants (1-14 ans) souffrant d'un accès palustre simple à un traitement par une dose de SP et de leur faire un contrôle parasitologique et clinique aux 3<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour. La persistance de la maladie, témoignée par une parasitémie et la présence de symptômes matérialisée par la fièvre signe l'échec thérapeutique. Le choix des enfants de cette tranche d'âge se justifie par l'absence d'une immunité efficace et donc la mesure de la capacité intrinsèque des parasites à résister au médicament.

L'utilisation des méthodes moléculaires d'étude de la chimiorésistance de *P.falciparum* en permettant la détection de résistances de bas niveau clinique et difficilement détectables par le test d'efficacité thérapeutique aura pour conséquence une meilleure évaluation du phénomène.

## I.2 LA DHFR ET LE GENE DHFR

Pour sa multiplication, *Plasmodium falciparum* a besoin de bases puriques et pyrimidiques. Il les obtient en transformant les folates. Cependant *Plasmodium falciparum* ne peut utiliser qu'une très faible proportion des folates de l'hôte présents dans le plasma. Le parasite doit alors en assurer une synthèse propre à partir d'un précurseur : l'acide para-amino-benzoïque (PABA). Des enzymes indispensables à ce processus dont la DHFR sont ainsi utilisées.

Une première enzyme plasmodiale, la dihydroptéroate-synthétase (DHPS) catalyse la synthèse de l'acide dihydrofolique ou dihydrofolate à partir du PABA.

Puis intervient une seconde enzyme, la dihydrofolate-reductase (DHFR). L'enzyme DHFR est couplée dans la même protéine que la thymidilate-synthétase (TS), autre enzyme du parasite d'où la dénomination d'enzyme bifonctionnelle de ce couple.

Dans un premier temps la DHFR réduit le dihydrofolate en tétrahydrofolate. Puis la TS condense le tétrahydrofolate avec l'acide désoxyuridilique pour former un désoxythymidylate, précurseur direct des bases puriques (Adénine et Guanine), constituants fondamentaux de l'ADN plasmodial (figure n°2).

Les médicaments antifoliques agissent à deux niveaux de cette synthèse. Les sulfamides (sulfadiazine, sulfadoxine) et les sulfones (dapsons), plus concentrés dans les hématies parasitées que les hématies saines, inhibent par compétition avec le PABA l'action de la DHPS. La Pyriméthamine et les biguanides (proguanil, cycloguanil, chlorproguanil) ont pour cible le DHFR qu'ils inhibent en entrant en compétition avec le dihydrofolate.

Le génome plasmodial se compose de 14 chromosomes non visibles en microscopie optique conventionnelle (16). Le parasite est diploïde pendant le stade de zygote et haploïde pendant les autres stades.

Le gène de la dihydrofolate-reductase codant pour la synthèse de l'enzyme du même nom a été identifié et localisé : c'est un segment de 727 paires de base situé sur le 4<sup>ème</sup> chromosome plasmodial.

L'amplification de ce gène et sa mise en évidence permet la diagnose de la parasitose. Cependant la PCR faite par cette méthode demeure encore un test qualitatif ne permettant ni d'évaluer la parasitémie, ni de préciser les stades évolutifs en présence. En outre il ne permet pas d'affirmer la maladie chez un sujet vivant en zone d'endémie.

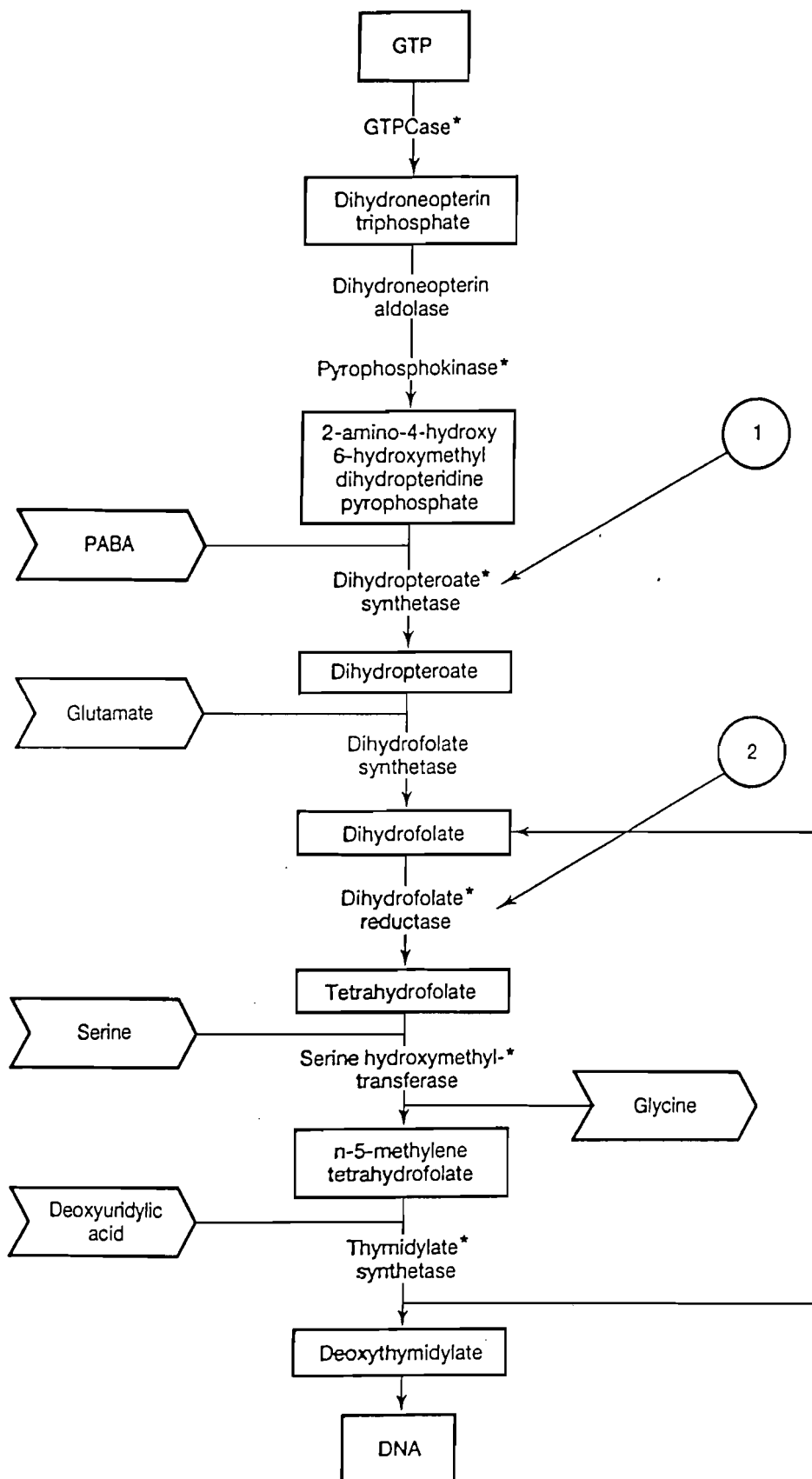


Figure n°2 : Représentation simplifiée du métabolisme des folates chez les plasmodies et sites d'action des antifoliques.  
(extrait de GILLES and WARRELL Bruce-Chwatt's essential malariaology 1993)



# OBJECTIFS

## II. OBJECTIFS

Notre travail a visé les objectifs suivants :

### II.1 OBJECTIF GENERAL

Etudier les mutations du codon 108 du gène DHFR d'isolats de *Plasmodium falciparum* provenant d'enfants malades de 1-14 ans à Bobo-Dioulasso.

### II.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. Détecter par deux méthodes les mutations du codon 108 du gène DHFR d'isolats de *Plasmodium falciparum* des jours J0, J7 et J14 d'enfants malades et traités par la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine (FANSIDAR®).
2. Comparer les mutations du codon 108 du gène DHFR d'isolats de *Plasmodium falciparum* des jours J0, J7 et J14.
3. Comparer les profils de résistance de *P. falciparum* obtenus selon les deux méthodes.

# MATERIEL ET METHODES

### III. MATERIEL ET METHODES

#### III. 1 MATERIEL

Les parasites étudiés sont des isolats de *Plasmodium falciparum* provenant d'enfants de 1 à 14 ans résidant dans la ville de Bobo-Dioulasso et présentant un accès palustre simple. Ces sujets étaient soumis au test d'efficacité thérapeutique à la sulfadoxine – pyriméthamine (FANSIDAR®) selon la méthode de 14 jours de l'OMS, entre Août et Septembre 1997.

Les principaux critères d'inclusion ont été les suivants:

- Présence d'une température axillaire supérieure ou égale à 37°5 et inférieure à 39°5 lors de la visite;
- Infection monospécifique à *Plasmodium falciparum*, avec une parasitémie comprise entre 2.000 et 100.000 parasites asexués par µl de sang (par la technique de la GE);
- Absence d'état fébrile dû à des maladies autres que le paludisme;

Le test a consisté à l'administration de sulfadoxine-pyriméthamine à la dose unique de 25 mg de sulfadoxine et 1,25 mg de pyriméthamine par kg de poids aux sujets retenus. Puis un suivi clinique (température et examen physique) et parasitologique (GE) sur 14 jours a été fait, principalement aux jours J<sub>3</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>. La réponse clinique au traitement a été appréciée en terme de réponse clinique satisfaisante (ou succès thérapeutique) et d'échec thérapeutique selon des critères bien définis.

Notre échantillon se confond à celui du test d'efficacité thérapeutique. C'est un échantillon exhaustif de la période d'étude. Ainsi 56 sujets répondant aux critères d'inclusion a été étudié. Chez ces patients, 58 prélèvements sanguins sur papier filtre WATMAN ont été réalisés à J<sub>0</sub> (avant traitement) et à J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub> au moment du contrôle de l'efficacité thérapeutique. Parmi eux, deux ont été inclus

deux fois portant le total des prélèvements à 58 lots de confetti des jours J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>.

Les confetti ainsi confectionnés ont été séchés à température ambiante pendant 1 à 3 jours puis ensachés individuellement et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Le prélèvement sanguin a été fait au bout du doigt et par conséquent toutes les formes érythrocytaires de *P. falciparum* (trophozoïtes jeunes et âgés, et gamétocytes principalement) sont susceptibles d'avoir été prélevés.

Le matériel génétique parasitaire a été extrait du confetti par la méthode du Chélex et conservé à 4° avant la PCR.

## III.2 METHODES

### III.2.1. Réactifs

#### III. 2.1.1 Réactifs pour l'extraction de l'ADN plasmodial:

- Solution de saponine à 10% ;
- Phosphate-buffered saline : PBS 1X (pH 7.4) ; (SIGMA)
- Solution de Chelex 100 à 20%. (SIGMA)

#### III. 2.1.2 Réactifs pour la PCR :

a) Pour la 1<sup>ère</sup> PCR, un couple d'amorces AMP1 et AMP2 (EUROGENTEC) a été utilisé pour l'amplification d'une portion de 720 paires de bases du gène DHFR (19, 20). Leurs séquences sont respectivement :

AMP1 : 5'-TTTATATTTTCTCCTTTTA-3' (sens)

AMP2 : 5'-CATTTTATTATTCGTTTCT-3' (antisens)

b) Pour la 2<sup>ème</sup> PCR, trois amorces (EUROGENTEC) spécifique chacune de l'amplification dépendant d'une mutation ont été utilisées, couplées chacune à l'amorce SP1. Ce sont :

DIA 3 : 5'-GAATCCTTTCCCAGC-3' (sens) pour la sérine (Ser)  
(sauvage)

DIA 9 : 5'-GAATGCTTTCCCAGG-3' (sens) pour la thréonine (Thr)

DIA12 : 5'-GGAATGCTTTCCAGT-3' (sens) pour l'asparagine (Asn)

SP1 : 5'-ATGATGGAACAAGTCTGCGAC-3' (antisens)

c) Tampon de réaction à la concentration 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100mM, 1% Triton X-100 pH 7,9). (EUROGENTEC)

d) dNTP (mélange à quantité égale de dATP, dCTP, dGTP, et dTTP) à la concentration de 5 mM de chaque (EUROGENTEC) ;

e) Taq polymérase, solution de 5 UI/μl (EUROGENTEC)

f) Eau distillée stérile ADN-free (SIGMA)

g) Chlorure de magnésium à la concentration de 25 mM. (EUROGENTEC)

### III. 2.1.3 Réactifs pour la digestion enzymatique

Les enzymes :

- Alu I (EUROGENTEC)
- SrfI (EUROGENTEC)
- Bsr I (BIOLABS)

Les tampons :

- tampon de Bsr I: NaCl 100 mM, Tris-HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9. (BIOLABS)

- tampon Alu I et Scrif I : Tris-HCl 10mM, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, BSA 0,2 mg/ml, glycérol 50% pH 7,5. (EUROGENTEC)

### III. 2.1.4 Réactifs pour la migration, et la révélation

- marqueur de taille d'oligonucléotides (marqueur M4 d'EUROGENTEC) donnant 13 fragments de 421 à 19329 pb.
- agarose (EUROGENTEC)
- solution de bromure d'éthidium (E-7637 SIGMA)
- bleu de charge (EUROGENTEC)
- tampon d'électrophorèse (TBE 1X) (SIGMA)

### III.2.2 Les instruments

- a) thermocycleur PERKIN-ELMER 480
- b) bac à électrophorèse HOEFER
- c) appareil photo POLAROÏD

### III.2.3. Protocoles

Les méthodes que nous avons utilisé sont principalement celles décrites par PLOWE et collaborateurs (30) et DE PECOULAS et collaborateurs (13), mieux adaptée aux conditions de travail de terrain et aux réalités des laboratoires en Afrique.

### III.2.3.1. Extraction de l'ADN plasmodial

**Préparation :** Un morceau d'environ 30 mm<sup>2</sup> (correspondant à 5-10 µl a été de sang séché) a été découpé dans le confetti puis placé au fond d'un microtube à fond conique.

**Elimination de l'hémoglobine :** L'hémoglobine a été éliminée par addition de 1 ml de PBS à pH 7,4 et 50 µl de solution de saponine à 10% suivie d'une incubation overnight.

Puis les tubes ont été centrifugés à 5.000 tours/minute pendant 2 minutes et le surnageant devenu rougeâtre a été éliminé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

**Rinçage:** On a alors ajouté 1 ml de PBS 1X (sans saponine) par tube, remué par retournement 5-10 fois, et incubé 2-4 heures à 4°C. Il s'en est suivi une centrifugation à 5.000 tours/minute pendant 2 minutes et l'élimination du surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Puis on a ajouté 100 µl d'eau stérile dans chaque tube.

**Extraction de l'ADN proprement dite :** 50 µl de Chélex 20% a été distribué dans chaque tube contenant déjà le confetti lavé de l'hémoglobine. Les tubes ont alors été placés sur un portoir flottant, et mis à incuber 10 minutes dans un bain -marie à 95 °C. Pendant l'incubation les tubes ont été individuellement retirés toutes les 2 – 3 minutes et agités au vortex puis remis à incuber.

A la fin de l'incubation les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 10.000 tours/minute et le surnageant contenant l'ADN extrait est transféré dans 2 microtubes à fond conique de 0.5 ml préalablement étiquetés. Des cônes à filtre de 200µl ont été utilisés à cet effet.



La solution d'ADN ainsi obtenue a été centrifugée encore une fois pendant 5 minutes à 10.000 tours/minute pour la débarrasser des restes de débris de papier et le surnageant final (blanc à jaunâtre) a été transféré dans des microtubes à fond conique de 0.5 ml préalablement étiquetés.

**Conservation de la solution d'ADN :** L'ADN extrait a été alors conservé à 4°C pendant au maximum 14 jours en attendant la PCR.

### III.2.3.2. Première PCR : Amplification du gène DHFR

**Préparation :** La réaction PCR a été faite dans un volume final de 50 µl par échantillon, ce qui correspond en volume à :

- eau : 9 µl
- tampon 10X : 5 µl (correspondant à 1X dans le volume final)
- dNTP : 1 µl (200 µM de dATP, dCTP, dGTP, et dTTP)
- AMP1 : 4,2 µl (correspondant à 25 pM)
- AMP2 : 6,4 µl (correspondant à 25 pM)
- MgCl<sub>2</sub> : 4 µl (correspondant à 1,5 mM)
- Taq pol. : 0,4 µl (correspondant à 2 UI)
- ADN : 20 µl de l'extrait

**Étapes :** Les étapes suivantes d'amplification ont été observées : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, suivie de 45 cycles d'amplification (dénaturation : 94°C - 30 secondes, amorçage : 45°C - 45 secondes, et élongation : 72°C - 45 sec.), et d'une extension finale à 72°C pendant 5 minutes.

**Analyse :** Le produit d'amplification a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 1% imprégné de bromure d'éthidium. Pour cela un mélange du

produit et de bleu de charge a été déposé à migrer dans un tampon d'électrophorèse (TBE 1X) sous un champ électrique de 100 V et de 170 mA pendant 1 heure.

L'analyse a été faite concomitamment avec un témoin positif, un témoin négatif, un témoin nul (blanc) et un marqueur de taille d'oligonucléotides.

**Révélation et Photographie :** La révélation a été faite sous lumière ultraviolette et une photographie polaroïd effectuée.

**Interprétation :** Les bandes rendues visibles sous lumière UV traduisent la présence de segments d'ADN. Lorsque celles ci correspondent à la taille du gène DHFR (720 paires de bases) en comparaison avec les bandes de tailles connues du marqueur, elles révèlent la présence du gène et donc de *Plasmodium falciparum*.

Lorsque la première PCR était positive, révélant l'amplification du gène DHFR, et seulement dans ce cas la recherche des mutations géniques a été entreprise par les deux méthodes que sont la deuxième PCR mutation-dépendante et la digestion enzymatique.

III.2.3.3. Deuxième PCR : Amplification mutation-dépendante (1<sup>ère</sup> méthode)

Elle a été réalisée pour tous les échantillons dont l'amplification du gène DHFR a été positive.

Pour chacun de ces échantillons de première PCR positive, 3 amorces spécifiques chacune d'un codon (muté ou non) ont été utilisées pour la 2<sup>ème</sup> PCR.

La première amorce (DIA3) permet d'amplifier les souches sensibles portant une sérine (Ser) en position 108. La deuxième amorce (DIA12) permet d'amplifier les souches résistantes à la pyriméthamine pour lesquelles la sérine en position 108 a été remplacée par une asparagine (Asn). La troisième amorce (DIA9) permet quant à elle d'amplifier les souches résistantes au proguanil/cycloguanil pour lesquelles la sérine en position 108 a été remplacée par une thréonine (Thr).

Pour chacune des amorces l'amplification aboutit à un segment d'ADN de 339 paires de bases

Ainsi 3 tubes correspondant à chaque couple d'amorces spécifique de la souche sauvage et de chacune des deux mutations ont été préparés (tableau I).

**Tableau I** : Amorces de la 2<sup>ème</sup> PCR suivant les caractéristiques moléculaires de résistance aux antifoliques

Codon	DHFR	(a.a)	Statut	Amorce sens	Résistant à
108	(Ser)	sauvage	DIA 3	-	
108	(Asn)	mutant	DIA 12	pyriméthamine	
108	(Thr)	mutant	DIA 9	cycloguanil/proguanil	

**Préparation :** La réaction PCR a été faite dans un volume final de 50  $\mu$ l par échantillon, ce qui correspond en volume à :

- tampon 10X : 5  $\mu$ l (correspondant à 1X dans le volume final)
- dNTP : 1  $\mu$ l (200  $\mu$ M de dATP, dCTP, dGTP, et dTTP)
- DIA :
  - DIA 3 : 2,1  $\mu$ l,
  - DIA 9 : 2,7  $\mu$ l,
  - DIA 12 : 3  $\mu$ l (correspondant à 25 pM chaque)
- SP1 : 4,5  $\mu$ l (correspondant à 25 pM)
- MgCl<sub>2</sub> : 4  $\mu$ l (correspondant à 1,5 mM)
- Taq pol. : 0,4  $\mu$ l (correspondant à 2 UI)
- eau : qsp pour 50  $\mu$ l
- ADN : 0,5  $\mu$ l du produit de la première PCR (amplicon DHFR)

**Étapes :** Les étapes suivantes d'amplification ont été observées : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, suivie de 15 cycles d'amplification (dénaturation : 94°C – 30 secondes, amorçage : 55°C - 45 secondes, et élongation : 74°C - 45 sec.), et d'une extension finale à 74°C pendant 5 minutes.

**Interprétation :** la présence de bandes correspondant à la taille de 339 paires révèle l'amplification et donc de la mutation spécifique selon l'amorce ou les amorces utilisées.

### III.2.3.4. Digestion par les endonucléases (2<sup>ème</sup> méthode)

**Principe :** Les mutations survenant sur le codon 108 sont également détectables en procédant à une digestion par des endonucléases capables de reconnaître une mutation donnée et de couper le brin d'ADN à cet endroit (8).

Ainsi les enzymes de restriction Alu I, Bsr I et Scrf I coupent le gène DHFR en deux portions de 324 et 376 paires de bases (ou 328 et 372 pb pour BsrI) en présence respectivement de Ser-108 (sauvage), d'Asn-108 (pyriméthamino-résistant) et de Thr-108 (proguanil/cycloguanil-résistant) (tableau II).

Pour cela le gène DHFR amplifié est mis à incuber en présence de chacune des enzymes à la température optimale de cette dernière. La digestion intervient si la mutation existe. Sinon le segment DHFR reste entier.

Pour chaque échantillon DHFR positif, un tube a été préparé par enzyme, soit 3 tubes par échantillon.

Les produits de la digestion sont mis en évidence par électrophorèse en gel d'agarose à 2%.

Tableau II : Endonucléases suivant les caractéristiques moléculaires de résistance aux antifoliques

(a.a)	Statut	Enzyme	Séq coupée	Taille des fragments
(Ser)	sauvage	Alu I	AG / CT	324, 376
(Asn)	mutant (Pyr)	Bsr I	ACT / GGN	328, 372
(Thr)	mutant (Pro)	Scrf I	CCN / GG	324, 376

**Préparation :** Dans un volume final de 250 µl par réaction, il a été préparé une solution comme indiqué dans le tableau III :

**Tableau III** : Mode de préparation des échantillons pour la digestion enzymatique

TUBE	1 <sup>er</sup> tube (sauvage)	2 <sup>ème</sup> tube (mutant Pro)	3 <sup>ème</sup> tube (mutant Pyr)
Tampon	25 µl	25 µl	25 µl
Enzyme	Alu I : 0,5 µl	Scrf I : 0,5 µl	Bsr I : 1 µl
ADN	50 µl	50 µl	50 µl
Eau	Qsp pour 250 µl	Qsp pour 250 µl	Qsp pour 250 µl

**Incubation** : Une incubation au bain-marie d'au moins 16 heures a été faite. A 65°C pour Bsr I, et à 37°C pour Alu I et Scrf I :

**Analyse** : Le produit d'amplification a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 2% imprégné de bromure d'éthidium dans les mêmes conditions techniques et physiques que pour la première PCR.

L'analyse a été faite concomitamment avec un témoin nul (blanc) et un marqueur de taille d'oligonucléotides.

**Révélation et Photographie** : La révélation a été faite sous lumière ultraviolette et une photographie polaroid effectuée.

**Interprétation** : La présence de bandes de 322 et 386 paires de bases (pb) témoignent de la digestion et ainsi de la nature de la base. Lorsqu'il n'y a pas eu de digestion, le gène DHFR reste entier et apparaît à hauteur des 720 pb.

### III.3 GESTION ET ANALYSE DES DONNEES

Les données et résultats des différents tests ont été consignés sur les registres puis saisis ensuite sur ordinateur à l'aide des logiciels Excel et Word. Les clichés polaroid des gels de migration ont également été conservés.

L'analyse des données a été faite avec Epi Info version 6.

# RESULTATS



## IV. RESULTATS

### IV.1 RESULTATS GENERAUX

#### IV. 1.1. Résultats de l'amplification du gène DHFR

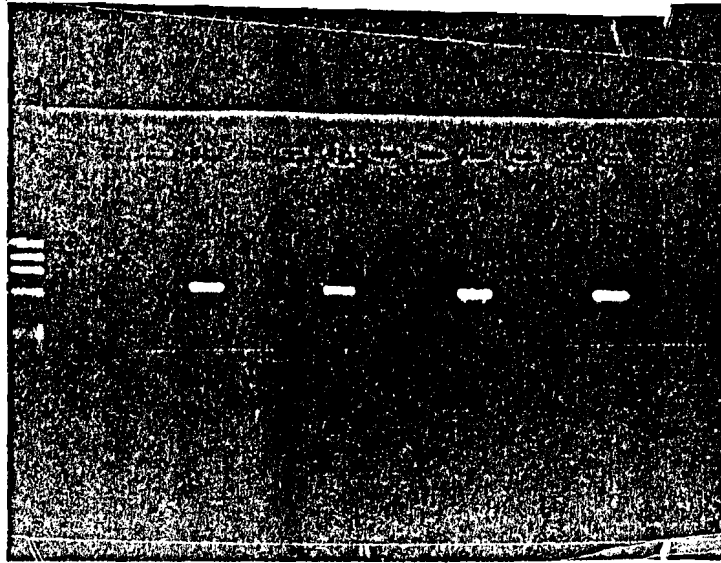
Tableau IV. Résultats de l'amplification du gène DHFR de 174 prélèvements

Lot de confetti	J <sub>0</sub> (n=58)	J <sub>7</sub> (n=58)	J <sub>14</sub> (n=58)	Total (n=174)
Résultats				
Positifs [DHFR+]	58	3	3	64
Négatifs [DHFR-]	0	55	55	110

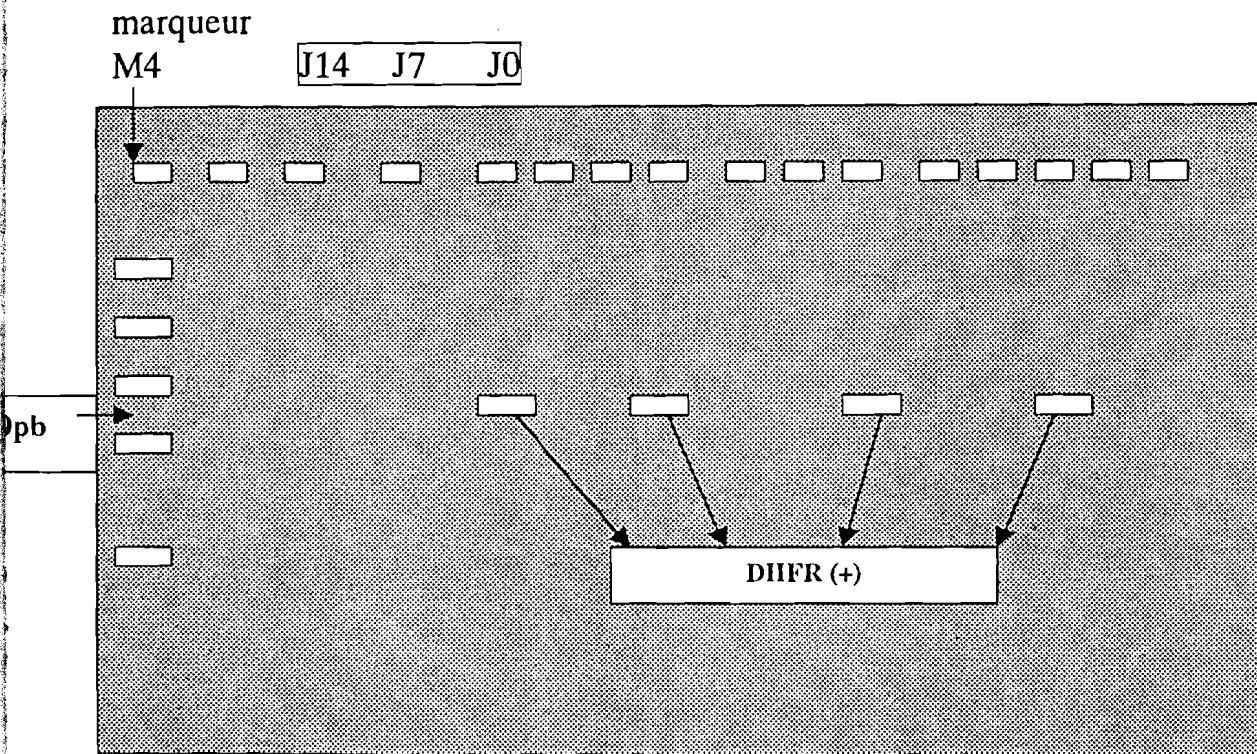
Un total de 58 jeux de confetti a été traité. Un jeu étant composé des confetti des jours J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub> prélevés chez le même sujet, ce sont 58 X 3 (174) échantillons qui ont été traités. Une réaction d'amplification du gène DHFR a été effectuée pour chacun de ces échantillon.

A l'issue de la PCR, la détection du gène DHFR, traduisant la présence de *P. falciparum* était matérialisée par la présence de bandes de 720 paires de bases (figure n°3) à l'électrophorèse du produit d'amplification.

64 réactions étaient positives, traduisant la présence de *P. falciparum* et 110 étaient négatives (tableau IV). Parmi les réactions positives, 58 étaient celles des prélèvements de J<sub>0</sub>, soit le total des prélèvements du premier jour. Cela traduit la bonne sensibilité de la PCR comme test diagnostic. Par contre seuls 3 réactions sur 58 étaient positives à J<sub>7</sub> d'une part et 3 sur 58 à J<sub>14</sub> d'autre part. Pour ces 6 réactions positives, une concordance a été observée avec les résultats de la GE sauf pour un échantillon de J<sub>7</sub> pour lequel la GE était négative alors que la PCR était positive.



**Figure 3** : photographie du gel de révélation du gène DHFR



**Figure 3 bis** : schéma du gel de révélation du gène DHFR

#### IV. 1.2. Résultats de l'amplification mutation-dépendante

Tableau V. Résultats globaux de l'amplification mutation-dépendante de 192 isolats [DHFR+].

Résultats	Isolats comportant des sous pop. Sauvages [S]	Isolats comportant des sous pop. [Prog] <sup>R</sup>	Isolats comportant des sous pop. [Pyr] <sup>R</sup>
Nombre	42 (72%)	49 (84,5%)	53 (91%)

Une mutation a été recherchée sur les 64 échantillons pour lesquels la PCR DHFR était positive ([DHFR+]).

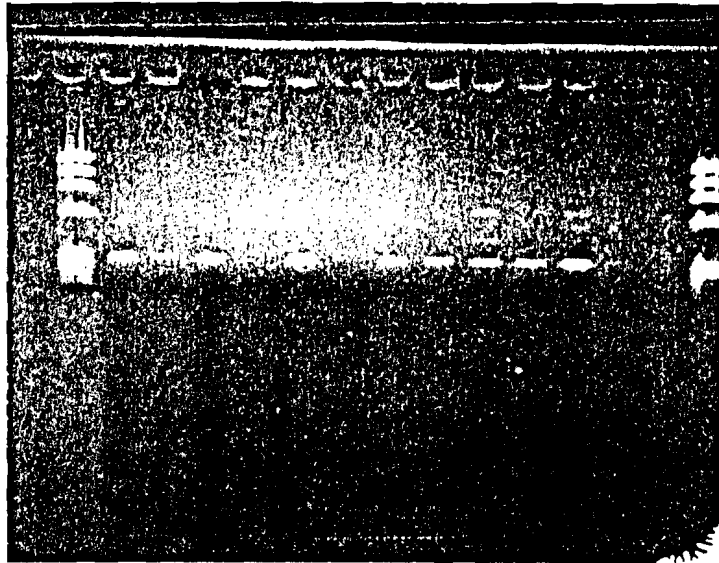
3 couples d'amorces (DIA3, DIA12, DIA9) ont été utilisées sur chacun de ces échantillons soit 192 réactions PCR.

A la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, la présence de bandes de 339 paires de bases traduit l'amplification mutation-dépendante et donc la présence de la mutation concernée (figure n4°).

L'amplification avec l'amorce DIA3 correspond à la présence de sous-populations sensibles [S]. Celle avec l'amorce DIA12 la présence de sous-populations Pyriméthamine-résistant [Pyr]<sup>R</sup> et enfin celle avec l'amorce DIA9 la présence de sous-populations Proguanil-résistant [Prog]<sup>R</sup>.

Un isolat peut comporter à la fois des sous-populations sensibles et des sous-populations résistantes à l'une ou aux deux drogues. Ce phénomène est traduit par l'amplification avec deux ou trois des amorces spécifiques pour le même échantillon.

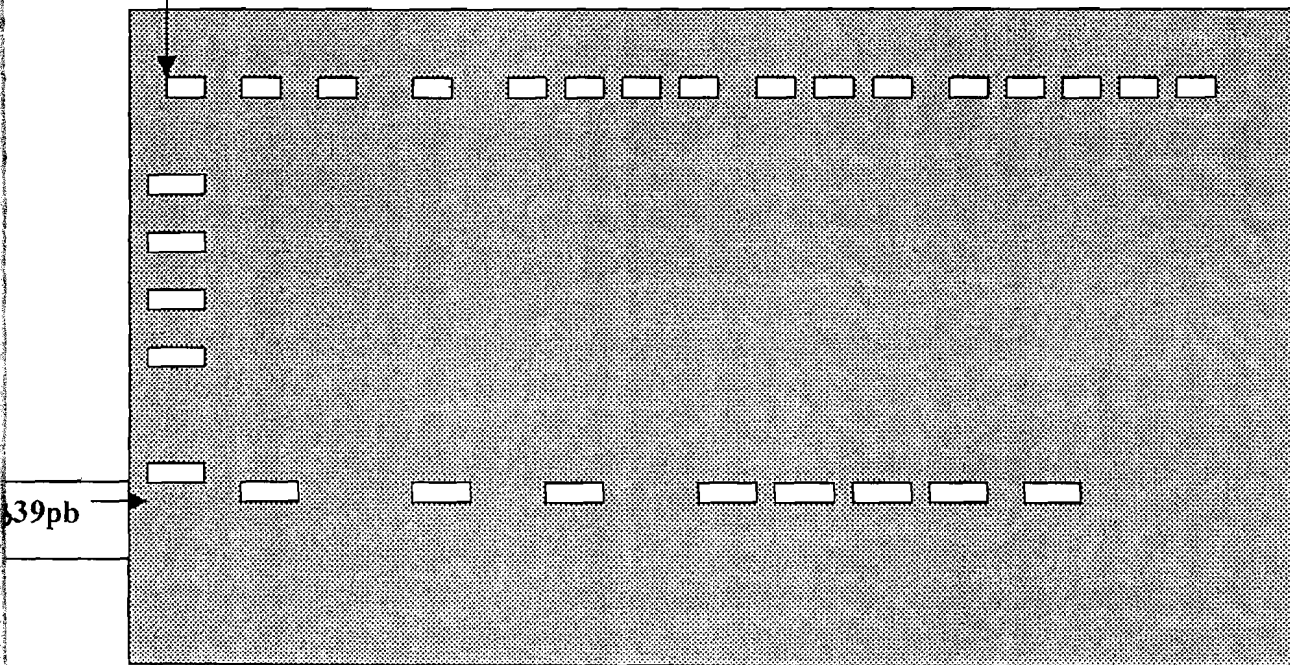
42 isolats comportaient des sous-populations de phénotype sauvage c'est à dire sans mutation et par conséquent sensibles ([S]). 49 isolats comportaient des sous-populations de phénotype [Prog]<sup>R</sup> (résistant au Proguanil) et 53 des sous-populations de phénotype [Pyr]<sup>R</sup> (résistant à la Pyriméthamine) (tableau V).



**Figure 4** : photographie du gel de révélation des mutations du gène DHFR par double PCR

marqueur

M4 S R1 R2



S = sensible, R1 = Prog<sup>R</sup>, R2 = Pyr<sup>R</sup>

**Figure 4 bis** : schéma du gel de révélation des mutations du gène DHFR par double PCR

#### IV. 1.3. Résultats de la digestion enzymatique

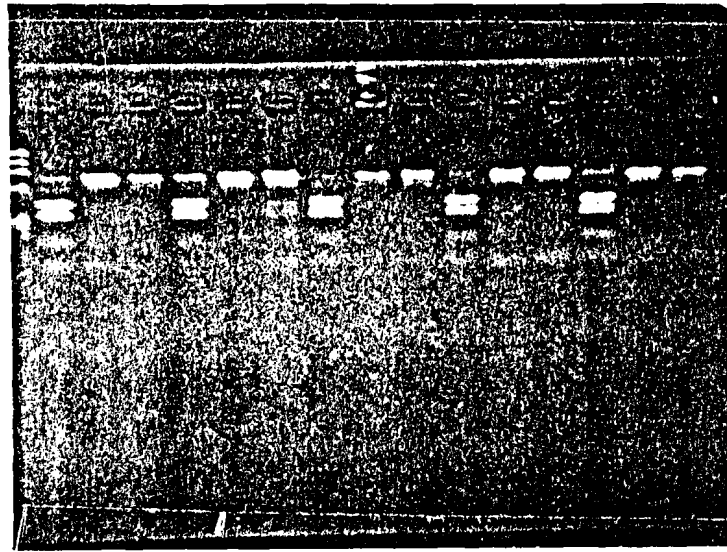
Tableau VI. Résultats globaux de la digestion enzymatique de 192 isolats [DHFR+].

Résultats	Isolats comportant des sous pop. Sauvages [S]	Isolats comportant des sous pop. [Prog] <sup>R</sup>	Isolats comportant des sous pop. [Pyr] <sup>R</sup>
Nombre	53	00	06

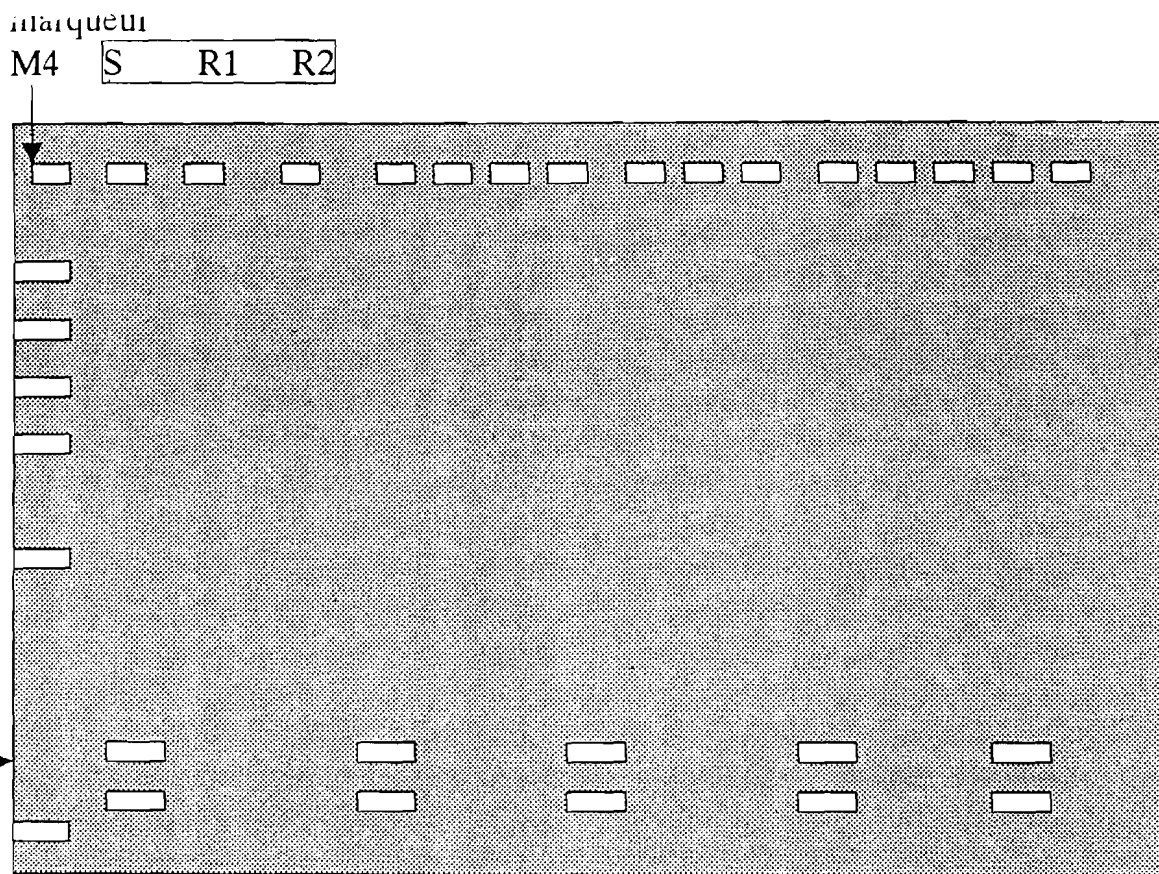
Les 64 échantillons [DHFR+] ont été soumis à cette méthode. 3 endonucléases (Alu I, Bsr I et Scrf I) coupant le segment DHFR en deux portions ont été utilisées pour détecter les mutations de chaque échantillon. Un total de 192 réactions a ainsi été effectué.

La digestion avec l'enzyme Alu I traduit la présence de sous-populations sensibles [S] (Ser-108, sauvage), et produit deux segments de 324 et 376 paires de bases. Celle avec l'enzyme Bsr I traduit la présence de sous-populations Pyriméthamine-résistant [Pyr]<sup>R</sup> (Asn-108) aboutissant à deux segments de 328 et 372 paires de bases et enfin celle avec l'enzyme Scrf I la présence de sous-populations Proguanil-résistant [Prog]<sup>R</sup> avec production de deux segments de 324 et 376 paires de bases.

A la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, la présence des deux bandes traduit la digestion mutation-dépendante (Thr-108) et donc la présence de la mutation concernée (figure n5°).



**Figure 5** : photographie du gel de révélation des mutations du gène DHFR après digestion enzymatique



S = sensible, R1 = Prog<sup>R</sup>, R2 = Pyr<sup>R</sup>

**Figure 5 bis** : schéma du gel de révélation des mutations du gène DHFR après digestion enzymatique

Comme dans l'amplification avec les amorces spécifiques de chaque mutation, un isolat peut comporter à la fois des sous-populations sensibles et des sous-populations résistantes à l'une ou aux deux drogues. Ce phénomène est ici aussi traduit par la digestion avec deux ou trois des enzymes spécifiques.

Les résultats de la digestion enzymatique sont les suivants (tableau VI).

53 isolats comportaient des sous-populations de phénotype sauvage c'est à dire sans mutation et par conséquent sensibles ([S]). Aucun isolat ne comportait de sous-populations de phénotype [Prog]<sup>R</sup> (résistant au Proguanil) et 6 comportaient des sous-populations de phénotype [Pyr]<sup>R</sup> (résistant à la Pyriméthamine) (tableau VI).

## IV.2 RESULTATS ANALYTIQUES

### IV. 2.1. Résultats analytiques de l'amplification du gène DHFR

Tableau VII : Corrélation des résultats de la PCR DHFR et de la GE par jeu de confetti.

Lot selon le jour	J <sub>0</sub>		J <sub>7</sub>		J <sub>14</sub>	
	PCR	GE	PCR	GE	PCR	GE
N° 115	[DHFR+]	Tropho+	[DHFR+]	Gaméto+	[DHFR+]	Gaméto+
N° 174	[DHFR+]	Tropho+	[DHFR+]	GE-	[DHFR+]	Gaméto+
N° 173	[DHFR+]	Tropho+	[dhfr-]	GE-	[DHFR+]	Gaméto+
N° 221	[DHFR+]	Tropho+	[DHFR+]	Tropho+	[dhfr-]	GE-
Les autres jeux de confetti (n=54)	[DHFR+]	Tropho+	[dhfr-]	GE-	[dhfr-]	GE-

Tropho+ : présence de trophozoïtes

Gaméto+ : présence de gamétocytes

GE- : GE négative

174 réactions d'amplification ont été effectuées. Tous les prélèvements de J<sub>0</sub> se sont révélés [DHFR+], 3 prélèvements de J<sub>7</sub> et 3 autres de J<sub>14</sub> se sont révélés [DHFR+].

Parmi les 6 prélèvements [DHFR+] de J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>, 2 sont positifs à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub> et J<sub>14</sub>, 1 est positif à J<sub>0</sub>, négatif à J<sub>7</sub>, et positif à J<sub>14</sub> tandis que le dernier est positif à J<sub>0</sub>, positif à J<sub>7</sub>, et négatif à J<sub>14</sub>. (tableau VII).



Les résultats de la PCR et ceux de la GE concordent concernant la diagnose parasitaire.

Dans un seul cas (J<sub>7</sub> du n° 174), la PCR a été positive tandis que la GE était négative.

#### IV. 2.2. Résultats analytiques de l'amplification mutation-dépendante

Tableau VIII : Associations des phénotypes de sous-populations selon les résultats de la PCR mutation-dépendante.

Caractéristiques	Isolats (n=58)	Isolats J <sub>7</sub> (n=3)	Isolats J <sub>14</sub> (n=3)
[S]	2	0	0
[Prog] <sup>R</sup>	0	0	0
[Pyr] <sup>R</sup>	3	0	1
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup>	3	0	0
Mixtes [S] + [Pyr] <sup>R</sup>	4	1	1
Mixtes [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>	13	1	0
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>	33	1	1
Total	58	3	3

En considérant les résultats de la PCR mutation-dépendante, plusieurs cas de figure d'association de sous-populations de phénotypes sensibles et/ou de résistants ont été rencontrés (tableau VIII).

En résumé, suivant cette méthode seuls deux isolats ont été trouvés entièrement sensibles [S]. Aucun isolat n'était exclusivement résistant au proguanil tandis que trois l'étaient à la pyriméthamine. Tous les autres sont des mélanges de populations de profils de résistance différents. Trente trois (33) isolats comportaient à la fois des populations mixtes sensibles, résistants au proguanil et à la pyriméthamine.

Sur un total de 58 prélèvements initiaux de malades:

- 53 (91,4%) comportaient des sous-populations de *Plasmodium falciparum* résistantes à la pyriméthamine ;
- 49 (84,5%) comportaient des sous-populations de *Plasmodium falciparum* résistantes au proguanil.

Dans le cas particulier du n° A221, une association de sous-populations sensibles, résistantes au proguanil et à la pyriméthamine a été mise en évidence à J<sub>0</sub>. A J<sub>7</sub> on a observé la disparition des sous-populations sensibles mais la persistance des sous-populations résistantes. Les sous-populations sensibles ont très probablement été éliminées par le traitement. A J<sub>14</sub> tous les parasites avaient disparus. A la GE, il a été constaté une forte baisse de la parasitémie à J<sub>7</sub> (36 trophozoïtes/mm<sup>3</sup> contre 207 900 à J<sub>0</sub>) avant leur disparition à J<sub>14</sub>.

Dans les autres cas de persistance de parasites à J<sub>7</sub> ou J<sub>14</sub> (4 cas), il s'agit de gamétocytes dont la présence a été observée à la GE (concordance de la positivité de la GE et de la PCR). Ces derniers présentaient exactement le même statut de résistance que l'isolat à J<sub>0</sub>.

#### IV. 2.3. Résultats analytiques de la digestion enzymatique

Tableau IX : Associations des phénotypes de sous-populations selon les résultats de la digestion enzymatique

Caractéristiques	Isolats	Isolats J <sub>0</sub> (58)	Isolats J <sub>7</sub> (3)	Isolats J <sub>0</sub> (3)
[S]		52	2	1
[Prog] <sup>R</sup>		0	0	0
[Pyr] <sup>R</sup>		5	0	1
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup>		0	0	0
Mixtes [S] + [Pyr] <sup>R</sup>		1	1	1
Mixtes [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>		0	0	0
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>		0	0	0
Total		58	3	3

En considérant les résultats de la digestion enzymatique mutation-dépendante, plusieurs cas de figure d'association de sous-populations de phénotypes sensibles et/ou de résistants ont été rencontrés (tableau IX).

Par cette méthode 52 isolats du premier jour ont été trouvés entièrement sensibles [S]. Aucun isolat n'était exclusivement résistant au proguanil tandis 5 l'étaient à la pyriméthamine. Dans un seul cas, un mélange de sous-populations [S] + [Pyr]<sup>R</sup> a été constaté.

Pour les isolats des 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour, le même profil de résistance qu'à J<sub>0</sub> a été observé dans 5 cas. Il s'agissait dans 4 cas de gamétocytes et dans un cas de trophozoïtes.

En résumé et par cette méthode, sur un total de 58 prélèvements initiaux de malades:

- 6 (10,3%) comportaient des sous-populations de *Plasmodium falciparum* résistantes à la pyriméthamine ;
- Aucun (0%) ne comportait de sous-populations de *Plasmodium falciparum* résistantes au proguanil.

### IV.3 RESULTATS COMPARATIFS DES DEUX METHODES

Tableau X : tableau comparatif des résultats selon les deux méthodes.

Caractéristiques	Isolats J <sub>0</sub> (n=58)		Isolats J <sub>7</sub> (n=3)		Isolats J <sub>0</sub> (n=3)	
	2 <sup>ème</sup>	Digest	2 <sup>ème</sup>	Digest	2 <sup>ème</sup>	Digest
	PCR	Enzym	PCR	Enzym	PCR	Enzym
[S]	2 (3,4%)	52 (90%)	0	2	0	1
[Prog] <sup>R</sup>	0	0	0	0	0	0
[Pyr] <sup>R</sup>	3 (5%)	5 (9%)	0	0	1	1
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup>	3	0	0	0	0	0
Mixtes [S] + [Pyr] <sup>R</sup>	4	1	1	1	1	1
Mixtes [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>	13	0	1	0	0	0
Mixtes [S] + [Prog] <sup>R</sup> + [Pyr] <sup>R</sup>	33 (57%)	0	1	0	1	0
Total	58	58	3	3	3	3

Des isolats de J<sub>0</sub> 3,4% sont [S] selon la double PCR tandis que 90% le sont selon la digestion enzymatique ( $X^2 = 86, p < 0,0001$ ).

Alors que 53 isolats de J<sub>0</sub> (91, 4%) comportaient des sous-populations [Pyr]<sup>R</sup> selon la double PCR, seuls 6 isolats (10%) comportaient de telles sous-populations avec la méthode de la digestion enzymatique ( $X^2 = 76, p < 0,0001$ ).

84,5% des isolats de J<sub>0</sub> comportaient des sous-populations [Prog]<sup>R</sup> selon la double PCR. Aucun isolat du même lot ne comportait de sous-populations [Prog]<sup>R</sup> selon la la digestion enzymatique.

# COMMENTAIRES ET DISCUSSION

## V. COMMENTAIRES ET DISCUSSION DES RESULTATS

La positivité de la première PCR sur tous les prélèvements de  $J_0$  traduit la bonne sensibilité de cette méthode de mise en évidence de *Plasmodium falciparum* même pour les faibles parasitémies. Cette puissance de la PCR comme moyen diagnostique a été relevée par de nombreux auteurs (23, 20, 38). N'ayant étudié que des échantillons sélectionnés sur la base de la goutte épaisse positive, il n'est pas adéquat de comparer cette méthode à la GE en utilisant les indicateurs de performance. Cependant la sensibilité de la PCR est perceptible par la détection de parasites même quand la GE est négative (1 cas dans notre étude).

La comparaison des deux méthodes entre elles a été rendue difficile par l'absence d'une méthode standard qui dans notre cas aurait dû être le séquençage de l'ADN.

Cependant, la différence nette des résultats pourrait être expliquée par la présence de faux positifs avec la méthode de double PCR. Cela est rendu plus probable par le décalage entre les résultats de cette méthode et ceux du test thérapeutique, la comparabilité des résultats de la digestion enzymatique avec ceux des études effectuées au Mali et l'observation de faux positifs par d'autres auteurs (29).

L'observation de nombreux faux positifs pourrait être liées à des facteurs difficilement maîtrisables telle que la quantité d'amplicon DHFR à traiter au cours de la deuxième PCR. Le rendement étant variable d'une réaction à l'autre, et le même volume d'amplicon étant pris pour chaque 2<sup>ème</sup> PCR, les résultats s'en trouveront différents.

La forte proportion de sous-populations [Pyr]<sup>R</sup> obtenue par la PCR double est en déphasage avec les résultats d'études similaires réalisées au Mali voisin où l'épidémiologie de la chimiorésistance ne devrait pas être très différente. Dans



une récente étude (31) menée dans ce pays la proportion de [Pyr]<sup>R</sup> a été de 23,4% contre 91,5% dans notre étude.

La méthode par la digestion enzymatique même si elle procure des résultats plus réalistes soulève néanmoins quelques questions. En effet le fait qu'aucune mutation Thr-108 n'aie été mise en évidence sur un effectif de 58 peut faire douter de la qualité de l'enzyme utilisée. Cependant d'autres auteurs ont décrit la faible prévalence de cette mutation sur de isolats africains et américains : 0/40 (2) et 0/42 (27).

Seuls 3 prélèvements à J<sub>7</sub> et 3 autres J<sub>14</sub> à se sont révélés positifs sur un total de 58 prélèvements à J<sub>7</sub> et 58 à J<sub>14</sub>. Ces résultats ne diffèrent pas de ceux de la GE et traduisent la réalité de l'élimination des parasites par le traitement en cours. Les stades parasitaires mis en évidence sont les gamétocytes qui sont des formes sexuées du parasite mais qui apparaissent également comme des formes de résistance du parasite. Dans un seul cas les trophozoïtes ont persisté au 7<sup>ème</sup> jour mais la parasitémie était très faible (36 trophozoïtes/ mm<sup>3</sup>) par rapport à celle du 1<sup>er</sup> jour (207.900 trophozoïtes/ mm<sup>3</sup>). Cela ne traduit pas une résistance et tous les parasites avaient disparu à J<sub>14</sub>.

Ce constat soulève le problème de l'utilisation de la PCR comme moyen de diagnostic. Outre la nécessité d'un matériel spécifique et la rigueur des précautions à prendre pour exécuter la technique, un grand nombre d'amorces doit être utilisé pour obtenir des résultats précisant l'espèce plasmodiale, et le ou les stades de développement. En outre la parasitémie sera difficilement estimée même si des méthodes de PCR quantitative sont proposées. Cette méthode trouve mieux sa place dans des études de type 'épidémiologie moléculaire'.

Les 58 jeux de confetti ont été prélevés chez 56 enfants de 1-14 ans présentant un accès palustre simple et soumis à un test d'efficacité thérapeutique à la

Sulfadoxine-Pyriméthamine (test OMS de 14 jours). Aucun échec thérapeutique n'a été observé malgré l'existence de sous-populations [Pyr]<sup>R</sup>. Cela peut s'expliquer par le fait que la SP est une combinaison synergique et que l'efficacité d'un des composants (ici la sulfadoxine) suffise à éliminer les parasites résistants à l'autre composé. Par ailleurs les conditions *in vivo* sont toujours différentes des tests *in vitro* et une certaine réaction immunitaire même non spécifique peut aider à l'élimination des parasites.

Dans les cas de détection de gamétocytes à la GE, l'amplification du gène DHFR a été positive. Cela se comprend aisément car le génome reste le même quelque soit le stade de développement du parasite. On peut cependant retenir que la méthode d'extraction de l'ADN des trophozoïtes est tout autant adapté aux gamétocytes aussi et que par conséquent le diagnostic par la PCR seule serait limité par son incapacité de distinguer le stade de développement des parasites.

Dans notre échantillon, deux sujets (respectivement âgés de 8 et 9 ans) ont été inclus deux fois pour des épisodes différents et en un intervalle moyen d'un mois. Dans les deux cas les populations sensibles avaient disparu au second épisode de la maladie. Cela laisse penser qu'il peut s'agir d'un cas de résistance clinique d'apparition tardive au delà des limites considérées pour le test d'efficacité thérapeutique.

## CONCLUSION

Nous avons utilisé deux méthodes de mise en évidence des mutations du codon 108 du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* conférant la résistance aux antifolates que sont la Pyriméthamine et le Proguanil/Cycloguanil. A partir du produit d'amplification du gène DHFR, la première méthode a consisté en une deuxième réaction d'amplification dépendant de la mutation et la seconde une digestion enzymatique par des endonucléases spécifiques des mutations.

L'amplification du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* a été comme attendu positive pour tous les prélèvements de J<sub>0</sub> et de façon générale les résultats de cette amplification sont en concordance avec ceux de la GE, traduisant la grande fiabilité de cette méthode. Par contre des divergences sont apparues quant aux résultats entre les deux méthodes. Une plus forte proportion de sous-populations résistantes aux deux composés a été constatée avec la PCR double. Bien qu'il n'y ait pas eu de méthode standard de contrôle, les résultats obtenus par la digestion enzymatique semblent plus fiables compte tenu de l'épidémiologie du paludisme dans des régions voisines et des résultats du test d'efficacité thérapeutique sur des sujets malades compte tenu des observations d'autres auteurs, de l'épidémiologie du paludisme dans des régions voisines et des résultats du test d'efficacité thérapeutique.

Se fiant aux résultats de la digestion enzymatique, on peut conclure que dans la région d'étude la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la Pyriméthamine est bonne (90% des isolats) et très bonne pour le Proguanil (100% des isolats).

Cette étude nous a surtout permis d'apprécier l'applicabilité dans les conditions de travail de notre laboratoire de ces nouvelles méthodes de biologie moléculaire.

L'utilisation de contrôles de bonne qualité sur des effectifs plus grands devrait nous permettre d'améliorer la technique et la rendre plus opérationnelle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) ARRONSON B., BENGTSSON E., BJORKMAN A., PEHRSON O.P., RONDO L., WAHLGREN M.  
Chloroquine resistant falciparum malaria in Madagascar and Kenya.  
*Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1981, **75**, 367-373
- 2) BASCO L.K., DE PECOULAS P.E., WILSON C.M., LE BRAS J., MAZZABRAUD A.  
Point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*  
*Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995, **69**, 135-138.
- 3) BOURGEADE A.  
Les chimio-résistances de *Plasmodium falciparum* en 1993  
*La lettre de l'Infectiologue*, 1993, **13**, VIII, 410-417.
- 4) BRYSKIER A., LABRO M.T.  
Paludisme et médicaments  
*Ed. Arnette*, Paris, 1988
- 5) BZIK, D.J., LI, W., HORII, T., INSELBURG, J.  
Molecular cloning and sequence analysis of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene.  
*The Proceeding of National Academy of Science USA*, 1987, **84**, 8360-8364.
- 6) Centre national de Lutte contre le Paludisme. Ministère de la Santé du Burkina Faso  
Rapport pour le système de surveillance épidémiologique mis en place dans la province d'Oubritenga.  
Ouagadougou, 1994.
- 7) CHARMOT G., AMAT-ROSE J.M., RHODAIN F., LEBRAS J., COULAUD J.P.  
Abord géographique de l'épidémiologie de la chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique tropicale.  
*Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1991, **71**, 187-197.

8) COULIBALY S.O., LAMIZANA L., PENALI K.L., GAYIBOR A., COMLANVI C.E., GAYE O, BOUREIMA H.S., NIANG D.S., MAIGA A.S., GBARY A.R., OUEDRAOGO J.B., GUIGUEMDE T.R.

La situation de la chimiorésistance du paludisme dans les états membres de l'OCCGE de 1991 à 1994.

*OCCGE Info*, 1995, 104, 7-14

9) COWMAN A.F., MORRY M.J., BIGGS B.A., CROSS G.A., FOOTE S. J.

Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*.

*Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, 1988, 85, 9109-9113.

10) DADJOUARI M. Contribution à l'évaluation de l'impact économique du paludisme chez les travailleurs d'entreprises.

*Thèse de Médecine*. F.S.S. Université de Ouagadougou. 1992. n° 23, 111 p.

11) DANIS M., MOUCHET J.

PALUDISME

*Ed. Ellipses/Aupelf*, Paris 1991, 240 p.

12) DAO F. Evaluation du coût de la lutte antipaludique à l'échelon familial dans la ville de Bobo-Dioulasso. BURKINA FASO

*Thèse de Médecine*, F.S.S. Université de Ouagadougou. 1992. n° 6, 92 p.

13) DE PECOULAS, P.E., BASCO, L.K., ABDALLAH, B., DJE M.K., LE BRAS J. MAZABRAUD, A.

*Plasmodium falciparum* : detection of antifolate resistance by mutation-specific restriction enzyme digestion.

*Experimental Parasitology*, 1995, 80, 483-487

14) DJIRE A.A. Analyse de la chimiorésistance du paludisme au BURKINA FASO 1992 à 1998.

*Thèse de Pharmacie*. F.S.S. Université de Ouagadougou. 1999. n° 7, 110 p.

15) ERLICH H. A.

PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification

*Oxford University Press*, 1992, 246 pages.

16) GILLES H.M., WARRELL D.A.

Bruce-Chwatt's essential malariaology

*Edward Arnold Ed.* Londres, 1993.

- 17) GUIGUEMDE, T.R., AOUBA, A., OUEDRAOGO, J.B. LAMIZANA L.  
Ten-year surveillance of drug resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991).  
*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994, **50**, 699-704.
- 18) GUIGUEMDE, T.R. GBARY, A.R., OUEDRAOGO, J.B. et coll.  
Point actuel sur la chimiorésistance du paludisme des sujets autochtones dans les états de l'OCCGE.  
*Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1991, **71**, 199-207.
- 19) GYANG, F.M., PETERSON, D.S., WELLEMS, T.E.  
*Plasmodium falciparum* : rapid detection of dihydrofolate reductase mutation that confer resistance to cycloguanil and pyrimethamine.  
*Experimental Parasitology*, 1992, **74**, 470-472.
- 20) HARAS D., AMOROS J.P.  
Réaction de Polymérisation en Chaîne, sondes froides et diagnostic clinique  
*Cahiers Santé* 1994; **4**, 43-52
- 21) KAIN, K.C. AND LANAR, D.E.  
Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1991, **29**, 1171-1174.
- 22) LE BRAS J., BASCO L.K., CHARMOT G.  
Les bases de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et ses différents profils  
*Cahiers Santé* 1993 ; **3** : 293-301
- 23) PARZY D. et autres  
Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.  
*Revue Française des Laboratoires*, 1999, (**315**), 43-48.
- 24) LE BRAS J., BASCO L.K., CREMER G., CHARMOT G.  
Apport de la génétique moléculaire à la compréhension des chimio-résistances de *Plasmodium falciparum*.  
*Bull. Soc. Path. Ex.*, 1992, **85**, 146-149.
- 25) Ministère de la Santé du Burkina Faso. Direction des Etudes et de la Planification  
Statistiques sanitaires nationales de l'année 1996.  
Ouagadougou, 1999.

26) Organisation Mondiale de la Santé. Division de la Lutte contre les maladies tropicales.

Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué dans les régions à transmission élevée  
*WHO/MAL/96.1077, Genève, 1996*

27) PETERSON, D.S., DI SANTI, S.M., POVOA, M., CALVOSA, V.S., DO ROSARIO, V.E., WELLEMS, T.E.

Prevalence of the dihydrofolate reductase Ans-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon.

*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1991, 45, 492-497.*

28) PETERSON, D.S. MILHOUS, W.K., WELLEMS, T.E.

Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria.

*The Proceedings of National Academy of Science USA, 1990, 87, 3018-3022.*

29) PETERSON, D.S., WALLIKER, D., WELLEMS, T.E.

Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria.

*Proceedings of the National Academy of the Science USA, 1988, 85, 9115-9118.*

30) PLOWE, C.V., DJIMDE, A., BOUARE M., DOUMBO, O., WELLEMS, T.E.

Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase : polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa.

*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 5, 565-568.*

31) PLOWE C.V., DJIMDE, A., WELLEMS, T.E., DIOP S. KOURIBA B., DOUMBO O.K.

Community Pyrimethamine-Sulfadoxine use and prevalence of resistant *Plasmodium falciparum* genotypes in Mali : a model for deterring resistance.

*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1996, 5, (55), 467-471.*

32) ROBERT V., GAZIN P., OUEDRAOGO V., CARNEVALE P.

Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)

Etude entomologique de la transmission

*Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., 1986, vol. XXIV, 2, : 121-128*



- 33) SNEWIN V.A., ENGLAND S.M., SIMS P.F.G., HYDE J.E.  
Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene  
from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine.  
*Gene*, 1989, **76**, 41-52
- 34) TRAGER W. et JENSEN J.B.  
Human malaria parasites in continuous culture  
*Science*, 1976, **193**, 673-675.
- 35) TRAPE J.F. et coll.  
Impact of chloroquine resistance on malaria mortality  
*C.R.Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* , 1998, **321**, 689-697.
- 36) UNDP/World Bank/WHO.TDR  
TDR Thirteenth programme report  
WHO GENEVA, 1997
- 37) VIRIYAKOSOL S. et coll.  
Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain  
reaction and potential uses in epidemiological studies.  
*Bulletin of the World Health Organization*, 1995, **73** (1) : 85-95.
- 38) WALLIKER D.  
The role of molecular genetics in field studies on malaria parasites.  
*International Journal for Parasitology*, 1994, **24** (6) 799-808.
- 39) WANG, P., et al.  
Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence  
analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a  
large number of field samples of diverse origins.  
*Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997, **89**, 161-177.
- 40) WERNSDORFER W.H., MCGREGOR I.  
Malaria principles and practice of malariology  
*Churchill Livingstone Ed. Londres*, 1988, 1818 p.
- 41) World Health Organization  
Tropical Disease Research : thirteenth programme report of the UNDP/Wolrd  
Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases  
(TDR)  
Geneva, WHO, 1997.

42) ZINDROU, S., DAO L.D., XUYEN, P.T., DUNG, N.P., SY, N.D., SKOLD, O., SWEDBERG, G.

Rapid detection of pyrimethamine susceptibility of *Plasmodium falciparum* by restriction endonuclease digestion of the dihydrofolate reductase gene.

*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996, **54**, 185-188.

43) ZOLG, J.W., PLITT, J.R. CHEN, G.X., PALMER S.

Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*.

*Molecular and Biochemical Parasitology*, 1989, **36**, 253-262.

44) ZOLG, J.W., CHEN, G.X., PLITT, J.R.

Detection for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction.

*Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995, **39**, 257-266.

## RESUME

Nous avons étudié les mutations du codon 108 du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* conférant la résistance aux antifolates (Pyriméthamine et Proguanil/Cycloguanil) de 64 isolats provenant d'enfants malades, résidents de la ville de Bobo-Dioulasso.

Deux méthodes de mise en évidence des mutations ont été utilisées. La première a été une PCR double faisant succéder à l'amplification du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* une amplification mutation – dépendante à l'aide d'amorces spécifiques. La seconde méthode a été une digestion par des enzymes de restriction mutation – dépendante du gène DHFR obtenue après une première amplification. L'amplification du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* de tous les prélèvements du premier jour ( $J_0$ ) a été concluante de même que celle des 7<sup>ème</sup> (n=3) et 14<sup>ème</sup> jour (n=3) pour lesquelles la GE était positive.

Les résultats de l'amplification du gène DHFR de *Plasmodium falciparum* sont en concordance avec ceux de la GE traduisant la grande fiabilité de cette méthode.

Par contre des divergences sont apparues entre les résultats des deux méthodes. Une plus forte proportion de sous-populations résistantes aux deux composés a été constatée avec la PCR double (91, 4% des isolats de  $J_0$  comportaient des sous-populations [Pyr]<sup>R</sup>, et 84,5% de sous-populations [Prog]<sup>R</sup>). Cette proportion est plus faible avec la méthode de la digestion enzymatique. Des isolats de  $J_0$ , seuls 6 (10%) comportaient des sous-populations [Pyr]<sup>R</sup>, aucun ne comportait de sous-populations [Prog]<sup>R</sup> tandis que 52 soit 90% comportaient des sous-populations exclusivement sensibles [S].

Cependant l'absence d'une méthode standard de contrôle n'a pas permis de départager les deux méthodes.

La méthode de la digestion enzymatique nous paraît néanmoins plus fiable.