

<b>PROCEDURE</b>	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

REDACTEURS	VERIFICATEURS	APPROBATEUR	DESTINATAIRES
IBRAHIM M. Laminou, Nicaise Ndam, Thomas KESTEMAN, Voahangy ANDRIANARANJAKA, Didier MÉNARD, Nimol KHIM, Frédéric ARIEY, Anne-Claire LANGLOIS	Laminou M. IBRAHIM Milijaona RANDRIANARIVELOJOSIA Voahangy ANDRIANARANJAKA Nicaise NDAM Odile OUWE MISSI OUKEM	Participants au projet PALEVALUT	Techniciens de laboratoire Biologistes
Date : 21/01/14	Date : 21/02/14	Date : 24/02/14	

**Objet :** La procédure définit la méthode d'évaluation de la présence ou absence de mutation au niveau des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments antipaludiques (sulfadoxine-pyriméthamine et dérivés de l'artémisinine) à partir d'ADN extrait de prélèvements sanguins d'individus infectés.

**Application :**  
Le document est élaboré pour le personnel chargé des manipulations de laboratoire de biologie moléculaire et de la validation des résultats ainsi produits.

**Documents associés :** POS BM-INFECT(A) pour la procédure d'extraction de l'ADN

**Annexes :** Nihil

### Historique des modifications:

Date	Version	Nature de la modification
04/09/2013	0	Création (IL, NN)
21/01/2014	1.0	Création procédure K13-propeller et harmonisation avec autres POS (TK)
24/01/2014	1.1	Corrections par les vérificateurs (VA)
10/02/2014	2.0	Fusion des procédures Bénin/Madagascar (TK)
21/02/2014	2.1	Ajustement de la procédure RFLP (NN, MR, VR, IL, TK)
24/02/2014	2.2	Prise en compte des suggestions des vérificateurs

### Contenu

1	Introduction.....	2
1.1	Contexte .....	2



PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

1.2	Principes des manipulations de laboratoire.....	3
2	Objectifs .....	4
3	Responsabilités.....	4
4	Matériel, réactifs et consommables.....	4
4.1	Matériel commun.....	4
4.2	Consommables communs .....	4
4.3	Réactifs communs .....	4
4.4	Réactifs spécifiques .....	5
5	Méthodes .....	6
5.1	Précautions.....	6
5.2	Extraction des ADN.....	6
5.3	1ère PCR .....	6
5.3.1	Préparation des ADN .....	6
5.3.2	Préparation du mix.....	6
5.3.3	Dépôt des témoins/ADN .....	7
5.3.4	Amplification sur le thermocycleur .....	7
5.4	2ème PCR (nested) .....	7
5.4.1	Préparation des amplicons.....	7
5.4.2	Préparation du mix.....	7
5.4.3	Dépôt des témoins/amplicons .....	8
5.4.4	Amplification sur le thermocycleur .....	8
5.5	Vérification de l'amplification sur gel d'agarose.....	8
5.6	Analyse par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	9
5.7	Préparation des amplicons pour séquençage .....	9
5.8	Interprétation des résultats .....	9
5.8.1	Lecture des séquences .....	9
5.8.2	Identification des mutations associées à la résistance .....	10
6	Références.....	11

## 1 Introduction

### 1.1 Contexte

Les antipaludiques utilisés à des fins curatives – dont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT), ou préventives – dont la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), jouent un rôle incontournable dans la lutte contre le paludisme. La résistance de *Plasmodium* sp aux antipaludiques est une menace majeure pour la lutte contre cette maladie. Suite à l'émergence de *P. falciparum* résistants à l'artémisinine et dérivés en Asie du Sud-Est [1], il est indiqué que tout pays, même en dehors de cette région géographique, mette en place une détection précoce de parasites potentiellement résistants à l'artémisinine et ses dérivés et à ces combinaisons thérapeutiques afin de vérifier que l'efficacité des ACT, utilisés en 1<sup>ère</sup> ligne dans le traitement des formes cliniques de paludisme. Dans les pays où la SP est utilisée en prévention de la survenue d'accès cliniques ou de complications de l'infection par *Plasmodium*,



<b>PROCEDURE</b>	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

dans le cadre du Traitement Préventif Intermittent durant la grossesse (TPIg) ou chez l'enfant (TPIe) aussi appelé Chimio-Prévention Saisonnière du paludisme chez les enfants (CPS), la résistance peut faire échouer ces stratégies préventives. Ainsi, la surveillance de la résistance de *Plasmodium* sp aux antipaludiques communément utilisés – notamment celle de *P. falciparum* – est cruciale. Cette surveillance peut se faire par des tests *in vitro*, complémentaires des tests *in vivo* (cf. POS SENS-VIVO), à partir d'extraits d'ADN du parasite. La présence et, le cas échéant, la proportion de parasites porteurs de traits génétiques associés à la résistance aux traitements antipaludiques et leur répartition géographique apportent une information importante pour évaluer l'efficacité du traitement dans un contexte géographique donné. *In fine*, le tableau complet des informations relatives à la résistance (*in vivo*, *in vitro*, mais aussi les données de recueillies via le système d'information sanitaire local) permet, si nécessaire, d'envisager la révision de la politique de traitement antipaludique.

## 1.2 Principes des manipulations de laboratoire

Idéalement, tous les échantillons positifs en PCR (voir POS BM-INFECT) pour *Plasmodium falciparum* seront analysés pour la recherche de marqueurs de résistance aux antipaludiques. Si ce nombre est trop élevé par rapport aux capacités techniques, humaines ou financières, un échantillon sera choisi aléatoirement parmi les échantillons positifs en PCR, avec un minimum de 188 échantillons (soit 2 plaques de 96 puits, sans les témoins positif et négatif).

La détection de la résistance à la SP repose sur le typage (génotypage) des gènes de la dihydrofolate reductase (*Pfdhfr*) et de la dihydropteroate synthetase (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum*. Des mutations clés successives sur des codons de ces gènes sont associées à une résistance croissante envers plusieurs molécules dont la SP [2–4].

La détection de la résistance aux dérivés d'artémisinine repose sur le génotypage de mutations ponctuelles du domaine en hélice de la protéine Kelch PF3D7\_1343700 localisée sur le chromosome 13 de *Plasmodium falciparum*, aussi appelé de façon plus synthétique *K13-propeller*. La procédure décrite ci-dessous est copiée de la procédure K13v1 développée par les Instituts Pasteur du Cambodge et à Paris [5].

Les manipulations de laboratoire se font en plusieurs étapes. La 1<sup>ère</sup> étape consiste à amplifier par nested-PCR les gènes-cibles de *P. falciparum* présents dans le sang de patients trouvés infectés (cf. POS EVAL-TDR, MICROSCOPIE et BM-INFECT).

Dans le cas de l'analyse de *pfdhfr* et *pfdhps*, une seconde étape peut être appliquée, consistant dans le typage par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) à la recherche de mutations-clés. La RFLP peut être mise en œuvre même en absence de facilités de séquençage et est moins coûteuse que ce dernier, mais n'est applicable qu'aux gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et non *K13-propeller*. Au cas où la RFLP est choisie, il est néanmoins recommandé de chercher à



<b>PROCEDURE</b>	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

séquencer, outre l'ensemble des fragments amplifiés de *K13-propeller*, les fragments des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* identifiés comme mutants par RFLP, ainsi qu'un échantillon de 10% des fragments identifiés comme sauvages (« *wild type* »).

La dernière étape consiste à séquencer les fragments des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *K13-propeller*. Les séquences obtenues sont comparées aux séquences de *P. falciparum* de type sauvage disponible en ligne (*GenBank*).

## 2 Objectifs

Détecter la circulation de *P. falciparum* présentant des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments antipaludiques que sont l'artémisinine et donc les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

## 3 Responsabilités

Technicien de laboratoire : application de la procédure de PCR, mise à jour du cahier de laboratoire, gestion des déchets, prévention de la contamination, contrôles de qualité.

Cadre (ingénieur de recherche ou biologiste) : interprétation et validation des résultats, rédaction du rapport d'analyses.

## 4 Matériel, réactifs et consommables

### 4.1 Matériel commun

- Thermocycleur
- Micropipettes de différents volumes
- Centrifugeuse/microcentrifugeuse
- Appareil d'électrophorèse sur gel d'agarose (cuve et générateur)
- Transilluminateur + casque ou écran de protection UV, appareil photos pour les gels

### 4.2 Consommables communs

- Pointes à filtre de différents volumes (10µl, 5-200µl, 100- 1000µl)
- Tubes de 200µl pour PCR
- Tubes de 1.5 ml pour centrifugation
- Marqueurs à pointe fine

### 4.3 Réactifs communs

- Taq : FirePol DNA polymerase I, [Solis Biodyne]
- 10X PCR buffer (MgCl<sub>2</sub>-free)



PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

- MgCl<sub>2</sub> 25mM
- dNTP mix, 25mM each [Fermentas]
- Eau sans nucléases
- ADN *P. falciparum* témoin positif (3D7 à 25 pg/μL)
- Electrophorèse sur gel d'agarose :
  - Colorant Xylène cyanol 6X
  - Ethidium bromide (10 mg/mL)
  - Agarose
  - Tampon TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X [ou TAE (Tris/Acetate/EDTA) 1X]
  - Marqueur de poids moléculaire 50 bp ou 100 bp ou 200 bp incluant le colorant xylène cyanol ; ou SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec) prêt à l'emploi
  - Parafilm
- Produits pour décontamination de l'ADN, type DNA-erase®

#### 4.4 Réactifs spécifiques

Gène cible	PCR	Taille fragment	Amorce	Séquence (5'-3')
<i>Pf dhfr</i>	1 <sup>ère</sup> PCR	718 pb	AMP1 pfdhfr108	TTTATATTTTCTCCTTTTTA
			AMP2 pfdhfr108	CATTTTATTATTCGTTTTCT
	Nested	699 pb	SP1 pfdhfr108	TGATGGAACAAGTCTGCGAC
			SP2 pfdhfr108	ACATTTTATTATTCGTTTTCT
<i>Pf dhfr</i> (RFLP)	1 <sup>ère</sup> PCR	642 pb	M1	TTTATGATGGAACAAGTCTGC
			M5	AGTATATACATCGCTAACAGA
	Nested 1	522 pb	M3	TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT
			F/	AAATTCTTGATAAACAACGGAACCTTTTA
	Nested 2	326 pb	F	GAAATGTAATTCCCTAGATATGGAATATT
			M4	TTAATTTCCCAAGTAAACTATTAGAGCTTC
<i>Pf dhps</i>	1 <sup>ère</sup> PCR	1326 pb	DHPS-1	CCATTCCTCATGTGTATACAACAC
			DHPS-2	GTTTAATCACATGTTTGCACCTTC
	Nested	609 pb	DHPS-F1	TGCTTAAATGATATGATACCC
			DHPS-R1	ATTCCTCTTTTATGCATTAG
<i>Pf dhps</i> (RFLP)	1 <sup>ère</sup> PCR	711 pb	R2	AACCTAAACGTGCTGTTCAA
			R	AATTGTGTGATTTGTCCACAA
	Nested	438 pb	K	TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC
			K/	CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA
<i>Pf K13-propeller</i>	1 <sup>ère</sup> PCR	2097 pb	K13_PCR_F	CGGAGTGACCAATCTGGGA
			K13_PCR_R	GGGAATCTGGTGGTAACAGC
	Nested	849 pb	K13_N1_F	GCCAAGCTGCCATTCATTG
			K13_N1_R	GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA



PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

## 5 Méthodes

### 5.1 Précautions

- Tout échantillon doit être considéré comme potentiellement infectieux et doit être traité avec les précautions d'usage.
- Pour éviter toute contamination par l'ADN, des salles séparées doivent être prévues pour (1) la préparation des mix (pièce « pré-PCR »), (2) l'extraction d'ADN et le dépôt des ADN dans les mix de la 1<sup>ère</sup> PCR, (3) l'ouverture et la manipulation des tubes contenant des amplicons (pièce « post-PCR »). Des blouses et du matériel appropriés seront réservées aux manipulations dans chacune des pièces et les manipulateurs ne peuvent, durant une journée de travail, revenir d'une pièce d'extraction ou d'une pièce de post-PCR vers une pièce de pré-PCR. En outre, les paillasses doivent être soigneusement nettoyées à l'aide de produits destinés à la décontamination par l'ADN après chaque manipulation.

### 5.2 Extraction des ADN

L'ADN est extrait des échantillons sanguins conservés sur papier-filtre selon la méthode décrite dans la POS BM-INFECT (A). Ils sont conservés à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3 1ère PCR

#### 5.3.1 Préparation des ADN

- Décongeler les ADN à tester, prévoir un ADN de *P. falciparum* témoin positif et un témoin négatif
- Utiliser les ADN purs ou dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau DNase/RNase free
- Les centrifuger brièvement afin qu'il y ait pas de liquide dans le bouchon.

#### 5.3.2 Préparation du mix

- Travailler sous hotte, dans une pièce réservée aux préparations de mix.
- Calculer les quantités de réactifs à ajouter en fonction du nombre de tubes (+1) à réaliser selon le tableau suivant:

Réactifs	Concentration initiale	<i>Pf dhfr, Pf dhps</i>		<i>Pf K13-propeller</i>	
		Volume pour 1 tube ( $\mu\text{l}$ )	Concentration finale	Volume pour 1 tube ( $\mu\text{l}$ )	Concentration finale
Eau		11,55		13,3	
Tp Buffer	10X	2,5	1X	2,5	1X
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5	2,5 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	25mM	0,2	0,2 mM	0,2	0,2 mM
Amorce 1	10 $\mu\text{M}$	2,5	1 $\mu\text{M}$	0,625	0,25 $\mu\text{M}$
Amorce 2	10 $\mu\text{M}$	2,5	1 $\mu\text{M}$	0,625	0,25 $\mu\text{M}$
Taq	5 U/ $\mu\text{l}$	0,25	1,25 U	0,25	1,25 U
<b>Total mix</b>		<b>22</b>		<b>20</b>	
<b>ADN ajouté</b>		<b>3</b>		<b>5</b>	
<b>Volume final</b>		<b>25</b>		<b>25</b>	

- Déposer dans un microtube stérile de 1,5 mL, dûment identifié, les volumes respectifs de chaque réactif ; refermer le microtube après chaque ajout.



PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

- Vortexer doucement le mix et le centrifuger très brièvement.
- Distribuer le volume nécessaire de mix (22 ou 20 µl) dans les tubes pour PCR.

### 5.3.3 Dépôt des témoins/ADN

- Travailler dans la pièce réservée à l'extraction d'ADN.
- Identifier les tubes de PCR.
- Répartir les ADN : déposer dans chaque tube le volume nécessaire d'ADN extrait (3 ou 5µl) ou d'eau (pour le témoin négatif).
- Refermer les tubes.

### 5.3.4 Amplification sur le thermocycleur

	<i>Pf dhfr</i>	<i>Pf dhps</i>	<i>Pf dhfr/dhps</i> (RFLP)	<i>Pf K13-propeller</i>
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C, 5 min	95°C, 5 min	94°C, 3 min	95°C, 15 min
<b>N cycles de</b>	35 cycles	35 cycles	40 cycles	30 cycles
Dénaturation	95°C, 40 sec	95°C, 40 sec	94°C, 1 min	95°C, 30 sec
Hybridation	45°C, 40 sec	56°C, 40 sec	50°C, 2 min	58°C, 2 min
Elongation	72°C, 1 min	72°C, 2 min	72°C, 2 min	72°C, 2 min
<b>Elongation Finale</b>	72°C, 10 min	72°C, 15 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min

- Conserver les amplicons à une température ≤ +4°C (si conservation de plus d'une semaine : ≤ -20°C).

## 5.4 2ème PCR (nested)

### 5.4.1 Préparation des amplicons

- Sortir les tubes contenant les amplicons à tester.
- Les centrifuger brièvement afin qu'il n'y ait pas de liquide dans le bouchon.

### 5.4.2 Préparation du mix

- Travailler sous hotte
- Calculer les quantités de réactifs à ajouter en fonction du nombre de tubes (+1) à réaliser selon le tableau suivant:

Réactifs	Concentration initiale	<i>Pf dhfr, Pf dhps</i>		<i>Pf K13-propeller</i>	
		Volume pour 1 tube (µl)	Concentration finale	Volume pour 1 tube (µl)	Concentration finale
Eau		27,1		31,7	
<b>Tp Buffer</b>	10X	5	1X	5	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	5	2,5 mM	5	2,5 mM
<b>dNTP</b>	25mM	0,4	0,2 mM	0,4	0,2 mM
<b>Amorce 1</b>	10µM	5	1 µM	1,25	0,25 µM
<b>Amorce 2</b>	10µM	5	1 µM	1,25	0,25 µM
<b>Taq</b>	5 U/µl	0,5	2,5 U	0,4	1,25 U
<b>Total mix</b>		48		45	
<b>ADN (amplicon) ajouté</b>		2		5	
<b>Volume final</b>		50		50	



PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

- Déposer dans un microtube stérile de 1,5 mL, dûment identifié, les volumes respectifs de chaque réactif (bien respecter l'ordre, refermer le microtube après chaque ajout).
- Vortexer doucement le mix et le centrifuger très brièvement.
- Distribuer le volume nécessaire de mix (48 ou 45 µl) dans les tubes pour PCR.

#### 5.4.3 Dépôt des témoins/amplicons

- Travailler dans une pièce réservée pour la post-PCR
- Identifier les tubes de PCR.
- Déposer dans chaque tube 2 ou 5 µl d'amplicon ou d'eau (pour le témoin négatif).
- Refermer les tubes.

#### 5.4.4 Amplification sur le thermocycleur

- Déposer les tubes dans le thermocycleur et appliquer le protocole suivant :

	<i>Pf dhfr</i>	<i>Pf dhps</i>	<i>Pf dhfr / dhps</i> (RFLP)	<i>Pf K13-propeller</i>
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C, 5 min	95°C, 5 min	94°C, 2 min	95°C, 15 min
<b>N cycles de</b>	30 cycles	30 cycles	35 cycles	40 cycles
Dénaturation	95°C, 40 sec	95°C, 40 sec	94°C, 1 min	95°C, 30 sec
Hybridation	45°C, 30 sec	50°C, 30 sec	45°C, 1 min	60°C, 1 min
Elongation	72°C, 1 min	72°C, 1 min 30 sec	72°C, 2 min	72°C, 1 min
<b>Elongation Finale</b>	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min

- Conserver les amplicons à une température ≤ +4°C (si conservation de plus d'une semaine : ≤ -20°C).

### 5.5 Vérification de l'amplification sur gel d'agarose

- Préparer un gel d'agarose à 2% :
  - Ajouter 2 g d'agarose dans 100 mL de TBE 1X
  - Chauffer dans le four à micro-ondes et agiter doucement jusqu'à dissolution
  - Laisser refroidir sans laisser solidifier puis ajouter 4 µL d'Ethidium bromide et agiter doucement pour mélanger
  - Verser dans le support dûment préparé et laisser refroidir à température ambiante pendant 30 minutes
- Préparer la migration :
  - Placer le gel dans l'appareil à électrophorèse et remplir de TBE 1X jusqu'à avoir couvert le gel
  - Déposer 2 µL de colorant (xylene cyanol) sur un parafilm par échantillon + 2 pour les marqueurs de poids moléculaire
  - Pipeter doucement 10 µL de produit de la nested PCR sur chaque goutte de colorant, faire 2-3 aller-retour avec la pipette puis déposer 10 µL d'[amplicons + colorant] délicatement dans le puits
  - Encadrer les produits de PCR par 2 marqueurs de poids moléculaire
- Faire migrer à 100-150 volts pendant 60 minutes et observer sous transilluminateur UV.
- Vérifier la présence d'amplicons de la taille attendue pour chaque échantillon.





PROCEDURE	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

## 5.6 Analyse par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Cette étape ne peut s'appliquer qu'aux gènes *Pf dhfr* et *Pf dhps*. Elle est facultative si on séquence directement les amplicons. Notons que cette étape requiert des PCR spécifiques.

Les fragments amplifiés par nested-PCR sont digérés pendant la nuit (*overnight*) selon les conditions de température, volume, concentrations, et éventuelle couverture par huile minérale, recommandées par le fabricant. Les fragments ainsi digérés sont observés sous lampe UV après migration sur gel d'agarose comme décrit à l'étape 5.5.

Gène	Codon	Amplicon	Enzyme	Type	Séquence	AA	Taille des fragments	Témoin
<i>Pfdhfr</i>	51	M3-F/	Tsp509I	Sauvage	AAT/AAC	N	55, 65, 120, 153 pb	K1
		M3-F/	Tsp509I	Mutant	ATT	I	55, 65, 120, 218 pb	W2
	59	F-M4	Xmn I	Sauvage	TGT	C	189, 163 pb	T9/96
		F-M4	Xmn I	Mutant	CGT	R	26, 137, 163 pb	K1
	108	F-M4	Alu I	Sauvage	AGC	S	118, 180 pb	T9/96
		F-M4	Alu I	Mutant	AAC/ACC	N/T	299 pb	K1
		F-M4	Bst NI	Sauvage	AGC	S	326 pb	T9/96
		F-M4	Bst NI	Mutant	ACC	T	145, 181 pb	FCR3
	164	M3-F/	Bsrl	Sauvage	AGC	S	522 pb	T9/96
		M3-F/	Bsrl	Mutant	AAC	N	190, 332 pb	K1
		M3-F/	DraI	Sauvage	ATA	I	107, 171, 145 pb	K1
		M3-F/	DraI	Mutant	TTA	L	107, 143, 145 pb	V1/S
<i>Pfdhps</i>	437	K-K/	Mwol	Sauvage	GCT	A	387, 41pb	FCR3
		K-K/	Mwol	Mutant	GGT	G	438 pb	K1
	540	K-K/	Avall	Sauvage	GCT	A	438 pb	FCR3
		K-K/	Avall	Mutant	GGT	G	404, 34pb	K1
	540	K-K/	FokI	Sauvage	AAA	K	438 pb	TN-1
		K-K/	FokI	Mutant	GAA	E	320, 85, 33pb	K1

## 5.7 Préparation des amplicons pour séquençage

- Aliquoter 40 µl de produits de nested-PCR pour le séquençage, conformément aux instructions de l'unité ou de la firme sous-traitante.

## 5.8 Interprétation des résultats

### 5.8.1 Lecture des séquences

- Aligner les séquences forward et reverse afin d'exclure des mutations artificielles et de produire une séquence complète du gène. Les électrophérogrammes sont visualisés et analysés avec un logiciel de type *Chromas Lite*.
- Aligner les séquences d'acides aminés déduites des séquences de nucléotides avec les séquences de référence *P. falciparum* de type sauvage disponible en ligne : *GenBank* XM\_001351443.1 pour *Pfdhfr*, Z30654.1 pour *Pfdhps* et XM\_001350122.1 pour *K-13 propeller* en utilisant un logiciel de type *Seaview* à la recherche des mutations clés associées à la résistance.



<b>PROCEDURE</b>	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

## 5.8.2 Identification des mutations associées à la résistance

### 5.8.2.1 Polymorphisme du gène *pfdhfr*

Les mutations suivantes sont connues pour être associées à la résistance aux antifolates [2, 3] :

Position du codon	Séquence aa référence	Séquence aa mutante	Séquence nucléotides référence	Séquence nucléotides mutante
16‡	A	V	GCA	GTA
50†	C	R	TGT	CGT
51	N	I	AAT/AAC	ATT
59†	C	R	TGT	CGT
108*	S	N	AGC	AAC
108‡	S	T	AGC	ACC
164	I	L	ATA	TTA

\* Mutation nécessaire pour conférer une résistance aux antifolates

† Mutations mutuellement exclusives

‡ Mutations nécessairement conjointes pour conférer une résistance aux antifolates

### Polymorphisme du gène *pfdhps*

Les mutations suivantes sont connues pour être associées à la résistance aux antifolates [2, 3] :

Position du codon	Séquence aa référence	Séquence aa mutante	Séquence nucléotides référence	Séquence nucléotides mutante
436	S	A	TCT	GCT
436	S	F	TCT	TTT
437*	A	G	GCT	GGT
540*	K	E	AAA	GAA
581	A	G	GCA	GGA
613	A	T	GCC	TCC
613	A	S	GCC	ACC

\* Mutations nécessaires pour conférer une résistance aux antifolates.

### 5.8.2.2 Polymorphisme du gène *K13-propeller*

Les mutations suivantes sont connues pour être associées à la résistance à l'artémisinine [1] :

Position du codon	Séquence aa référence	Séquence aa mutante	Séquence nucléotides référence	Séquence nucléotides mutante
449	G	A	ggt	gCt
458	N	Y	aat	Tat
474	T	I	aca	aTa
476*	M	I	atg	atA
481	A	V	gct	gTt



<b>PROCEDURE</b>	Réf. SENS-BM
Evaluation de la résistance moléculaire à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés	Version : 2.2
	Date : 24/02/2014

493†	Y	H	tac	Cac
508	T	N	act	aAt
527	P	T	cct	Act
533	G	S	ggt	Agt
537	N	I	aat	aTt
539†	R	T	aga	aCa
543‡	I	T	att	aCt
553	P	L	ccg	cTg
561	R	H	cgt	cAt
568	V	G	gtg	gGg
574	P	L	cct	cTt
580†	C	Y	tgt	tAt
584	D	V	gat	gTt
612**	E	D	gaa	gaT
623	S	C	agt	Tgt

\* Mutation pas observée au Cambodge, mais dans la souche expérimentale F32-ART5

\*\* Mutation pas observée au Cambodge, mais en Gambie

† Mutation associée avec un taux de survie RSA<sub>0-3h</sub> et une clairance parasitaire augmentés

‡ Mutation associée avec un taux de survie RSA<sub>0-3h</sub> augmentée

## 6 Références

1. Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale J-C, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D: **A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 2014, **505**:50–5.

2. Gregson A, Plowe C V: **Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates.** *Pharmacol Rev* 2005, **57**:117–145.

3. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam R a G, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley P a, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe C V: **Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of Plasmodium falciparum malaria.** *J Infect Dis* 2002, **185**:380–8.

4. Abdullah NR, Norahmad NA, Jelip J, Sulaiman LH, Mohd Sidek H, Ismail Z, Noedl H: **High prevalence of mutation in the Plasmodium falciparum dhfr and dhps genes in field isolates from Sabah, Northern Borneo.** *Malar J* 2013, **12**:198.

5. Ménard D, Khim N, Arie F, Langlois A-C: **PCR-Sequencing for genotyping SNPs PF3D7\_1343700 Kelch protein propeller domain v1.0 (Procedure).** 2013:1–12.

