

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

| 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 de *Plasmodium falciparum* 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 DIAG-MOLECULAR pour la procédure d'extraction de l'ADN

Annexes : Néant

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 |
| 01/02/2018 | 3.0 | Validation C. Rogier |

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

Sommaire :

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introduction..... | 3 |
| 1.1 | Contexte | 3 |
| 1.2 | Principes des manipulations de laboratoire..... | 3 |
| 2 | Objectifs | 4 |
| 3 | Responsabilités..... | 5 |
| 4 | Matériel, réactifs et consommables..... | 5 |
| 4.1 | Matériel commun..... | 5 |
| 4.2 | Consommables communs | 5 |
| 4.3 | Réactifs communs | 5 |
| 4.4 | Réactifs spécifiques | 6 |
| 5 | Méthodes | 6 |
| 5.1 | Précautions..... | 6 |
| 5.2 | Extraction des ADN..... | 7 |
| 5.3 | Premières PCR | 7 |
| 5.3.1 | Préparation des ADN..... | 7 |
| 5.3.2 | Préparation du mix..... | 7 |
| 5.3.3 | Dépôt des témoins/ADN | 8 |
| 5.3.4 | Amplification sur le thermocycleur | 8 |
| 5.4 | Deuxièmes PCR (nichées/nested)..... | 8 |
| 5.4.1 | Préparation des amplicons..... | 8 |
| 5.4.2 | Préparation du mix..... | 8 |
| 5.4.3 | Dépôt des témoins/amplicons | 9 |
| 5.4.4 | Amplification sur le thermocycleur | 9 |
| 5.5 | Vérification de l'amplification sur gel d'agarose..... | 10 |
| 5.6 | Analyse par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)..... | 10 |
| 5.7 | Préparation des amplicons pour séquençage | 11 |
| 5.8 | Interprétation des résultats | 12 |
| 5.8.1 | Lecture des séquences | 12 |
| 5.8.2 | Identification des mutations associées à la résistance | 12 |
| 6 | Références..... | 14 |

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

1 Introduction

1.1 Contexte

Les antipaludiques utilisés à des fins curatives – dont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA), 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 l'efficacité des CTA, utilisés en 1^{ère} 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*, 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 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 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 DIAG-MOLECULAR) pour *Plasmodium falciparum* sont 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 est 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 dihydroptéroate synthetase (*Pfdhps*) de *Plasmodium*

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

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 POS décrite ci-dessous est copiée de la procédure K13v1 développée par les Instituts Pasteur du Cambodge et à Paris [5]. La valeur prédictive de ces mutations pour la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine n'a pas été établie à ce jour en Afrique.

Les manipulations de laboratoire se font en plusieurs étapes. La 1^{ère} étape consiste à amplifier par nested-PCR les gènes-cibles de *P. falciparum* présents dans le sang de patients trouvés infectés.

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 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 (CTA) et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP).

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

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 200 µl 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 (MgCl₂-free)
- MgCl₂ 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

| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST-MOLECULAR |
|--|-----------------------|
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

- 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 ^{ère} PCR | 718 pb | AMP1 pfdhfr108 | TTTATATTTTCTCCTTTTAA |
| | | | AMP2 pfdhfr108 | CATTTTATTATTCGTTTTCT |
| | Nested | 699 pb | SP1 pfdhfr108 | TGATGGAACAAGTCTGCGAC |
| | | | SP2 pfdhfr108 | ACATTTTATTATTCGTTTTC |
| <i>Pf dhfr</i> (RFLP) | 1 ^{ère} PCR | 642 pb | M1 | TTTATGATGGAACAAGTCTGC |
| | | | M5 | AGTATATACATCGCTAACAGA |
| | Nested 1 | 522 pb | M3 | TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT |
| | | | F/ | AAATTCTTGATAAACAACGGAACCTTTTA |
| | Nested 2 | 326 pb | F | GAAATGTAATTCCTAGATATGGAATATT |
| | | | M4 | TTAATTTCCCAAGTAAACTATTAGAGCTTC |
| <i>Pf dhps</i> | 1 ^{ère} PCR | 1326 pb | DHPS-1 | CCATTCCTCATGTGTATACAACAC |
| | | | DHPS-2 | GTTTAATCACATGTTTGCACCTTC |
| | Nested | 609 pb | DHPS-F1 | TGCTTAAATGATATGATACCC |
| | | | DHPS-R1 | ATTCCTCTTTTATGCATTAG |
| <i>Pf dhps</i> (RFLP) | 1 ^{ère} PCR | 711 pb | R2 | AACCTAAACGTGCTGTTCAA |
| | | | R | AATTGTGTGATTTGTCCACAA |
| | Nested | 438 pb | K | TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC |
| | | | K/ | CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA |
| <i>Pf K13-propeller</i> | 1 ^{ère} PCR | 2097 pb | K13_PCR_F | CGGAGTGACCAAATCTGGGA |
| | | | K13_PCR_R | GGGAATCTGGTGGTAACAGC |
| | Nested | 849 pb | K13_N1_F | GCCAAGCTGCCATTCATTTG |
| | | | K13_N1_R | GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA |

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^{ère} PCR, et (3) l'ouverture et la manipulation des tubes contenant des

| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST-MOLECULAR |
|--|-----------------------|
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

amplicons (pièce « post-PCR »). Des blouses et du matériel appropriés sont réservés aux manipulations dans chacune des pièces. 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 DIAG-MOLECULAR. Ils sont conservés à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

5.3 Premières 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 1/10ème 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 (μl) | Concentration finale | Volume pour 1 tube (μl) | Concentration finale |
| Eau | | 11,55 | | 13,3 | |
| Tp Buffer | 10X | 2,5 | 1X | 2,5 | 1X |
| MgCl ₂ | 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 μM | 2,5 | 1 μM | 0,625 | 0,25 μM |
| Amorce 2 | 10 μM | 2,5 | 1 μM | 0,625 | 0,25 μM |
| Taq | 5 U/ μl | 0,25 | 1,25 U | 0,25 | 1,25 U |
| Total mix | | 22 | | 20 | |
| ADN ajouté | | 3 | | 5 | |
| Volume final | | 25 | | 25 | |

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

| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST-MOLECULAR |
|--|-----------------------|
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

- 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> |
|------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|-------------------------|
| Dénaturation initiale | 95°C, 5 min | 95°C, 5 min | 94°C, 3 min | 95°C, 15 min |
| N cycles de | 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 |
| Elongation Finale | 72°C, 10 min | 72°C, 15 min | 72°C, 10 min | 72°C, 10 min |

- Conserver les amplicons à une température $\leq +4^{\circ}\text{C}$ (si conservation de plus d'une semaine : $\leq -20^{\circ}\text{C}$).

5.4 Deuxièmes PCR (nichées/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:

| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST-MOLECULAR |
|--|-----------------------|
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

| 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 | |
| Tp Buffer | 10X | 5 | 1X | 5 | 1X |
| MgCl₂ | 25mM | 5 | 2,5 mM | 5 | 2,5 mM |
| dNTP | 25mM | 0,4 | 0,2 mM | 0,4 | 0,2 mM |
| Amorce 1 | 10µM | 5 | 1 µM | 1,25 | 0,25 µM |
| Amorce 2 | 10µM | 5 | 1 µM | 1,25 | 0,25 µM |
| Taq | 5 U/µl | 0,5 | 2,5 U | 0,4 | 1,25 U |
| Total mix | | 48 | | 45 | |
| ADN (amplicon) ajouté | | 2 | | 5 | |
| Volume final | | 50 | | 50 | |

- 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> |
|------------------------------|----------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Dénaturation initiale | 95°C, 5 min | 95°C, 5 min | 94°C, 2 min | 95°C, 15 min |
| N cycles de | 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 |
| Elongation Finale | 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).

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

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.

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 PCR nichée 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.

| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST-MOLECULAR |
|--|-----------------------|
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

| 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 |
| | | M3-F/ | Bsrl | Sauvage | AGC | S | 522 pb | T9/96 |
| | | M3-F/ | Bsrl | Mutant | AAC | N | 190, 332 pb | K1 |
| | 164 | 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 |
| | | 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.

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

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.

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

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

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 |
| 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 |

| | |
|--|---------------------------|
| Procédure Opératoire Standard n° 24 | DRUG-RESIST- MOLECULAR |
| Evaluation de la résistance moléculaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine et à l'artémisinine et ses dérivés Molecular evaluation of the resistance of <i>Plasmodium falciparum</i> to sulfadoxine-pyriméthamine and to artémisinine and its derivatives | Version : 3 |
| | Date : 01/02/2018 |

| | | | | |
|-------|---|---|-----|-----|
| 612** | E | D | gaa | gaT |
| 623 | S | C | agt | Tgt |

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

** Mutation non observée au Cambodge, mais en Gambie

† Mutation associée avec un taux de survie RSA_{0-3h} et une clairance parasitaire augmentés

‡ Mutation associée avec un taux de survie RSA_{0-3h} augmentée

6 Références

1. Ariey 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, Ariey F, Langlois A-C: PCR-Sequencing for genotyping SNPs PF3D7_1343700 Kelch protein propeller domain v1.0 (Procedure). 2013:1–12.