



**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO  
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE  
DE BOBO-DIOULASSO**  
(Doctorat Unique)

En

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Par

**Monsieur NAMBEOLE SOME Anyirékun Fabrice**

Sur le thème :

■

**Efficacité thérapeutique de trois antipaludiques et sélection des  
marqueurs de résistance de *Plasmodium falciparum* à Bobo-  
Dioulasso, Burkina Faso.**

Présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 2014 devant le  
jury composé de :

**Président :**

**M. Robert T. GUIGUEMDE**, Professeur titulaire, INSSA/UPB

**Membres :**

**M. Jean-Bosco OUEDRAOGO**, Directeur de Recherche, IRSS (Directeur de thèse)

**M. Adrien Marie Gaston BELEM**, Professeur titulaire, UPB, Bobo-Dioulasso

**M. Zachary BENGALI**, Chargé de Recherche, CIRDES, Bobo-Dioulasso

*A toute la famille Jean Kpein à  
Dissin Tãwzu*

## **REMERCIEMENTS :**

A l'attention de tout ceux qui liront ce document, il résulte de la collaboration entre **l'IRSS-DRO** et ses partenaires que sont : **FIC-NIH, UCSF, YU, LSTMH, PNL, UPB, UEMOA, UO**. Je tiens à adresser mes sincères remerciements à ces différentes institutions et très particulièrement aux personnes citées ci-dessous :

Ma première pensée au moment de mon inscription en thèse va vers Monsieur **Jean-Bosco OUEDRAOGO, MD, PhD**, Directeur de recherche, Directeur régional de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé. **M. JBO**, depuis mon DEA vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre laboratoire à l'IRSS-DRO et juste après vous m'avez proposé sans hésitation une inscription en thèse sous votre direction. Dans votre équipe de recherche au sein de l'IRSS-DRO, vous m'avez entièrement fait confiance en me confiant de grandes responsabilités. Depuis Juin 2007 à ce jour, j'ai pu beaucoup apprendre de votre longue expérience rigoureuse en sciences. A mes yeux comme aux yeux de plusieurs générations avant et certainement après moi vous êtes et vous resterez un modèle dans la recherche scientifique au Burkina Faso. Ce travail est entièrement le votre. Je vous remercie infiniment.

**Monsieur Robert T. GUIGUEMDE, MD, PhD**, Professeur titulaire de parasitologie-mycologie, Directeur de l'Institut Supérieur des sciences de la Santé, je vous remercie sincèrement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

**Monsieur Georges Anicet OUEDRAOGO, DMV, PhD**, Professeur titulaire, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, je vous remercie pour votre disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de vous. Merci également pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de Co-encadrer cette thèse en dépit de vos occupations multiples.

**Monsieur Marie Adrien Gaston BELEM**, Professeur titulaire en parasitologie animale à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, c'est un grand honneur pour nous de vous compter parmi les membres du jury. Je vous remercie également d'accepter être rapporteur de cette thèse et d'accepter siéger dans ce jury.

**Monsieur Halidou TINTO, PharmD, PhD**, Maître de Recherche à l'IRSS-DRO, je vous suis entièrement reconnaissant pour l'intérêt régulier que vous avez porté à l'aboutissement de cette thèse. Je vous remercie également d'accepter être rapporteur de cette thèse.

**Monsieur Zakaria BENGALY, PhD**, Chargé de recherche et Directeur Scientifique au Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso, je vous remercie d'accepter être rapporteur de cette thèse et d'accepter siéger dans ce jury.

**Monsieur Phillip John ROSENTHAL, MD**, Professeur titulaire, Chef de Laboratoire au département de Médecine, division des maladies infectieuses de l'Université de Californie, San Francisco ; c'est dans votre laboratoire que nous avons entièrement effectué l'ensemble de nos travaux. Vous avez accepté nous trouver les conditions nécessaires pour séjourner à San Francisco aussi longtemps que possible à chaque fois que nous en avons eu besoin. C'est le moment pour nous de vous adresser nos sincères remerciements.

**Messieurs K. Rock DABIRE** et **Zékiba TARNAGDA** respectivement Directeur de Recherche et Maître de Recherche, à l'IRSS-DRO, je vous remercie pour vos soutiens respectifs et vos conseils tout au long de cette thèse.

**Monsieur B. Gustave KABRE, PhD**, Professeur de parasitologie, vous m'avez guidé vers le laboratoire de l'IRSS-DRO qui est devenu depuis de nombreuses années ma maison. Je vous remercie.

**Monsieur Issaka ZONGO, MD, PhD**, c'est à vos côtés que j'ai débuté mon stage de DEA et ce fut réellement un grand plaisir pour moi. Aujourd'hui j'ai la chance de pouvoir exprimer l'ensemble de tout ce que j'ai appris dans un document qui est aussi le votre. Je vous remercie infiniment pour votre contribution.

**Monsieur Hermann SORGHU, PhD**, Chargé de recherche à l'IRSS-DRO, vous avez été pour moi l'aîné parfait qui a su guider mes pas dans et en dehors de la science. Sans votre soutien j'aurais sans doute baissé les bras à un moment donné ; fort heureusement, aujourd'hui je n'en suis pas là.

**Monsieur Serge YERBANGA, PhD**, Chercheur à l'IRSS-DRO, vous avez grandement contribué à la rédaction de ce document en acceptant d'y apporter vos corrections et suggestions. Je vous remercie sincèrement.

**Monsieur Bryan GREENHOUSE, MD, MSc**, Chercheur à UCSF, et **Monsieur Souleymane SAKANDE**, vous avez analysé une grande partie des données de ce travail. Merci pour vos contributions respectives dans l'analyse de ces données.

**Monsieur Sunil Parikh, MD, MPH, Professeur à l'Université de Yale**, je vous remercie pour vos conseils, soutiens et assistances durant mes séjours à UCSF et surtout pour cette confiance que vous avez placée en moi dans cette nouvelle collaboration entre l'IRSS-DRO et l'Université de Yale.

**Messieurs Augustin ZEBU et Noel ROUAMBA**, tous deux chercheurs à l'IRSS-DRO, je vous remercie pour vos conseils et vos soutiens depuis mes premiers pas à l'IRSS-DRO.

**A tous mes collègues et amis de l'IRSS-DRO, de l'UO, de l'université Cadi Ayyad de Marrakech,** je vous remercie individuellement pour tous vos soutiens et encouragements depuis le début de mes études universitaires jusqu'à nos jours.

**Au personnel Administratif et de soutien de l'IRSS-DRO,** Je vous remercie pour votre collaboration le long de cette thèse.

**A ma très chère chérie Adéline DABIRE,** ton soutien avant et tout au long de mon inscription à cette thèse a été inestimable. Tu m'as toujours pardonné les moments où je ne me suis pas rendu disponible pour toi et notre chouchou **Alex Edwin SOME**. Le travail accompli aujourd'hui est aussi le tiens et j'espère qu'il renforcera davantage notre amour. Je vous embrasse.

**Enfin à mes parents, mes frères et amis à DISSIN, Ouagadougou, Bobo-Dioulasso et France,** vous m'avez toujours été solidaires durant mes études et le travail accompli aujourd'hui ne saurait l'être sans cette solidarité familiale et amicale. Dans l'espoir que ce travail nous unisse davantage, je vous prie de trouver ici l'expression de ma très grande reconnaissance.

## **LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES**

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**AC** : anticorps  
**AL** : Artémether-Luméfantrine  
**AQ-SP** : Amodiaquine- Sulfadoxine-Pyriméthamine  
**ARN** : Acides Ribonucléiques  
**AS-AQ** : Artésunate-Amodiaquine  
**AS-MQ** : Artésunate-Méfloquine  
**AS-SP** : Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine  
**CEL**TOS : Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CPS** : Chimio-prévention du paludisme saisonnier  
**CQ** : Chloroquine  
**CSP** : Circum sporozoite protein  
**CTA** : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine  
**dATP** : déoxyAdénosine-TriPhosphate  
**DARC** : *Duffy* Antigen Receptor for Chemokines  
**dCTP** : déoxycytidine-triphosphate  
**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane  
**dGTP** : déoxyguanosine-triphosphate  
**DHA-PQ** : Dihydroartémisinine-Pipéraquline  
**Dhfr** : dihydrofolate reductase  
**Dhps** : dihydroptéroate synthetase  
**dNTP** : déoxynucléosides-triphosphates  
**DDD** : déoxythymidine-triphosphate  
**ECT** : Echec clinique tardif  
**EPT** : Echec parasitologique tardif  
**ETP** : Echec thérapeutique précoce  
**FIC** : Forgy International Center  
**RFP** : Faire reculer le Paludisme  
**G6PD** : Glucose – 6 – Phosphate Déshydrogénase  
**GAG** : glycosaminoglycanes  
**Hf** : hémoglobine foetale

**HLA** : Human Leucocyte Antigen

**IL4** : Interleukin-4

**IRSS-DRO** : Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale de l'Ouest

**LSTMH** : London school of Tropical Medecine and Hygien

**mA** : milliampère

**Mgcl2** : Chlorure de Magnésium

**ml** : Millilitre

**mM** : millimoles/litre

**MSP 1, 2** : Merozoite surface protein 1, 2

**NIH** : National Institut of Health

**Nm** : Nanomètre

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PBS** : Phosphate buffered saline

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PfATP6** : *Plasmodium falciparum* ATPase 6

**Pfcg2** : *Plasmodium falciparum* candidate gene 2

**PfCRT** : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

**Pfdhfr** : *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

**Pfdhps** : *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase

**PfEMP 1** : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

**PfHNE** : *Plasmodium falciparum* Natrium /hydrogen exchanger

**PfHRP2** : *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2

**Pfmdr1** : *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1

***P. falciparum*** : *Plasmodium falciparum*

***P. Knowlesi*** : *Plasmodium knowlesi*

***P. malariae*** : *Plasmodium malariae*

***P. ovale*** : *Plasmodium ovale*

***P. vivax*** : *Plasmodium vivax*

**pLDH** : *Plasmodium Lactate Déshydrogénase*

**PNLP** : Programme Nationale de Lutte Contre le Paludisme

**PQ** : Pipéraquline

**Pdb** : *Plasmodium vivax* Duffy – Binding Protein

**RCPA** : Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate

**Taq** : *Thermus acquiaticus*

**TBE** : Trisma Boric acid EDTA

**TDR** : Test de Diagnostic Rapide

**TPI** : Traitement préventif intermittent

**TPIe** : Traitement préventif intermittent chez l'enfant

**TRAP** : Thrombospondin-Related Anonymous Protein

**μM/L** : micro moles/litre

**UCSF** : University of California, San Francisco

**UO** : Université de Ouagadougou

**UPB** : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

**UEMOA** : Union Economique et Monétaire Ouest Africaine

**UV** : Ultra violet

**YU** : Yale University

**WHO** : World Health Organisation



## **LISTE DES FIGURES**

Figure I : Faciès de transmission du paludisme au Burkina Faso (Source : Centre Muraz).....	5
Figure II: Cycle évolutif de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	11
Figure III : Invasion des hépatocytes par <i>Plasmodium falciparum</i> (Prudencio <i>et al.</i> , 2006) .....	12
Figure IV : Libération des mérozoïtes hépatiques dans la circulation sanguine (Prudencio <i>et al.</i> , 2006).....	13
Figure V : Invasion des érythrocytes par des mérozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> (O'Donnell <i>et al.</i> , 2006). .	14
Figure VI : Cycle sporogonique de <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'anophèle femelle (Ghosh <i>et al.</i> , 2009).....	15
Figure VII : Structure du gène <i>merozoite surface protein-1</i> (Sakihama <i>et al.</i> 2007).....	17
Figure VIII : Structure du gène <i>merozoite surface protein-2</i> (Ekala <i>et al.</i> , 2002).....	17
Figure IX : Structure de la protéine PfMDR1 (Cowman, A.F. and S. Karez, 1993).....	18
Figure X : Structure de la protéine PfCRT (Bray <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figure XI : Répartition géographique du paludisme dans le monde (WHO, 2011) .....	20
Figure XII : Profil de l'étude comparant les efficacités thérapeutiques de AL, AQ-SP et DHA-PQ .....	48
Figure XIII: Profil de l'étude évaluant l'efficacité et la pharmacocinétique de la DHA-P .....	49
Figure XIV : Profil de l'analyse de laboratoire de la troisième étude .....	50
Figure XV: Estimation du risque d'échec au traitement .....	56
Figure XVI: Distribution de la concentration en PQ en fonction de la réponse au traitement .....	57

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Les différents médicaments antipaludiques .....	26
Tableau 2 : Les marqueurs de résistance associés aux différents antipaludiques.....	34
Tableau 3 : Composition des mélanges de la réaction PCR .....	41
Tableau 4 : Séquences d'amorces et programmes d'amplification des gènes MSP1 et MSP2 .....	42
Tableau 5 : Séquences d'amorces et programmes d'amplification de <i>pfmdr1</i> , <i>pfprt</i> et microsatellites .....	43
Tableau 6 : Sélection de polymorphismes après traitements à AL, AQ-SP ou DHA-PQ .....	52
Tableau 7 : Sélection de polymorphisme après traitement à la DHA-PQ .....	53
Tableau 8 : Effet de TPI à base de AQ-SP et DHA-PQ sur le polymorphisme génétiques de <i>P. falciparum</i> .....	54
Tableau 9 : Réponse au traitement en fonction de l'âge.....	55
Tableau 10: Efficacité thérapeutique de AQ-SP Vs Al Vs DHA-PQ.....	56
Tableau 11 : Concentration en PQ dans le sang capillaire et veineux en fonction de l'âge .....	57
Tableau 12 : Concentration plasmatique en PQ et réponses au traitement.....	58
Tableau 13 : Relation entre les mutations génétiques et les recrudescences après traitement à la DHA-PQ.....	58
Tableau 14 : Evolution de la clairance de la fièvre et de la parasitémie chez les participants .....	59
Tableau 15 : Proportion des effets secondaires chez les patients traités à la DHA-PQ.....	59

## RESUME

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est l'une des plus importantes maladies infectieuses du monde et son contrôle reste compromis par la propagation de la résistance du parasite aux antipaludiques disponibles. Le présent travail a évalué à travers différentes études cliniques la sélection des marqueurs de résistance de *Plasmodium falciparum* en réponse aux traitements antipaludiques ainsi que l'efficacité thérapeutique de la DHA-PQ et la pharmacocinétique de la PQ au jour 7.

Les résultats de la première étude montrent que AL sélectionne les séquences de types sauvages des gènes *pfprt* (K76) et *pfmdr1* (N86 et Y184) et que AQ-SP sélectionne le type mutant dans le gène *pfdhfr* (51I, 59R et 108N). Le traitement à la DHA-PQ n'a pas favorisé la sélection des polymorphismes testés. L'analyse d'échantillons supplémentaires de la deuxième étude clinique avec la DHA-PQ a confirmé l'absence de sélection des polymorphismes de *pfprt* et *pfmdr1*. Dans la troisième étude clinique, l'analyse de la sélection des polymorphismes montre que contrairement au TPI à la DHA-PQ, le TPI saisonnier à l'AQ-SP sélectionne de façon significative les séquences mutantes des gènes *pfprt* (76T) et *pfdhfr* (51I et 108N). Ces résultats suggèrent que la PQ qui est structurellement proche de la CQ et l'AQ n'aurait peut-être pas la même pression de sélection et probablement pas les mêmes mécanismes de résistance que ces deux antipaludiques. Cependant, en raison de la complexité des mécanismes de sélection, il serait bien d'envisager à l'avenir, l'ajout d'un autre médicament de longue demi-vie à la DHA-PQ en vue d'empêcher la sélection des parasites résistants à la PQ. Par ailleurs, la DHA-PQ a montré une excellente efficacité avec de bonnes tolérance et sécurité bien qu'il y ait eu près de 20% d'échec chez les enfants de moins de 5 ans. Les échecs reportés étaient dans la plupart des cas associés à une faible concentration en PQ, particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. Ainsi, la concentration plasmatique en PQ au jour 7 était plus faible chez les patients ayant eu des infections récurrentes. Les patients ayant une concentration en PQ inférieure à 57 ng/ml (seuil établi) avaient trois fois le risque d'infection récurrente.

L'efficacité de la DHA-PQ est donc excellente mais les infections récurrentes au cours des 42 jours de suivi sont fréquentes, particulièrement chez les petits enfants. L'optimisation de la dose chez les jeunes enfants serait donc idéale pour combler le manque en concentration plasmatique de la pipéraquline dans ce groupe.

## ABSTRACT

*Plasmodium falciparum* malaria is one of the most important infectious diseases in the world and its control remains hampered by the spread of parasite resistance to available antimalarial drugs. The present work evaluated through different clinical trials the selection of *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms following antimalarial treatment and the efficacy of DHA-PQ and day 7 pharmacokinetics of PQ in the treatment of uncomplicated malaria.

The results of the first trial showed that after prior AL therapy selected for wild-type sequences in *pfprt* (K76) and *pfmdr1* (N86 et Y184) and that AQ-SP selected for mutant in *pfdhfr* (51I, 59R, 108N). After prior DHA-PQ therapy did not selected for the tested polymorphism. An analysis of additional samples from the second clinical study with DHA-PQ confirmed the lack of selection for polymorphisms in *pfprt* and *pfmdr1*. In the third clinical study, the analysis of polymorphisms selection showed that seasonal IPT with SP-AQ selected significantly for mutant sequences in *pfprt* (K76) and *pfdhfr* (51I, 108N and triple mutant 51I,59R,108N) and that again, IPT with DHA-PQ did not select for the tested resistance-mediating polymorphisms .

These results suggest that PQ which is structurally related to CQ and AQ might not have the same selection pressure and probably not the same mechanisms of resistance . However, due to the complexity of the mechanisms of selection of resistance mediating polymorphisms, consideration should be given to adding a long-acting drug to DHA-PQ to protect against resistance selection to PQ.

DHA-PQ demonstrated excellent efficacy with good tolerability and safety, although treatment failures, generally due to new infections over 42 days after therapy, were seen in 20% of children less than 5 years of age. Recurrent parasitemia were mainly associated with low concentration of PQ, especially in children under 5 years. Thus, plasma concentration of PQ on day 7 was lower in patients with recurrent infections. Patients with capillary PQ concentration below 57 ng / ml (threshold) had a three-fold higher risk of recurrent parasitemia compared to patients with a concentration above this threshold.

Thus, DHA-PQ have demonstrated excellent efficacy against uncomplicated falciparum malaria. However, recurrences within 42 days after therapy were common, especially in young children. These results suggest that dose optimisation for DHA-PQ may improve its antimalarial efficacy in young children.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS :</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>I INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>II GENERALITES</b> .....	<b>3</b>
<b>II.1 LE BURKINA FASO</b> .....	<b>3</b>
II.1.1 Situation géographique du Burkina Faso.....	3
II.1.2 Données environnementales et climatiques du Burkina .....	3
II.1.3 Les faciès de transmission du paludisme au Burkina Faso .....	4
<b>II.2 LE PALUDISME</b> .....	<b>5</b>
II.2.1 Historique du paludisme .....	5
II.2.2 Les vecteurs du paludisme .....	8
II.2.3 Les plasmodies.....	9
II.2.4 Répartition géographique du paludisme dans le monde .....	19
II.2.5 Symptomatologie et évolution du paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
II.2.6 Diagnostic du paludisme .....	22
II.2.7 Traitement et prévention du paludisme .....	25
II.2.8 Immunité antipaludique.....	27
II.2.9 Résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> aux antipaludiques.....	29
<b>III MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>35</b>
<b>III.1 SITES D'ETUDE</b> .....	<b>35</b>
III.1.1 Le district sanitaire de Dô .....	35
III.1.2 Le district sanitaire de LENA .....	35
III.1.3 L'Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale de l'Ouest (IRSS-DRO) .....	36
III.1.4 La division des maladies infectieuses de l'Université de Californie, San Francisco (UCSF) .....	36
<b>III.2 SOURCES ET PERIODES DE COLLECTE DU MATERIEL BIOLOGIQUE</b> .....	<b>36</b>
<b>III.3 POPULATION D'ETUDE</b> .....	<b>37</b>
III.3.1 Estimation de la taille de l'échantillon des différentes études.....	37
III.3.2 Critères d'inclusion .....	37
III.3.3 Critères de non inclusion.....	38
<b>III.4 COLLECTE DES DONNEES</b> .....	<b>38</b>
III.4.1 Les prélèvements sanguins.....	38
III.4.2 Examens microscopiques des parasites.....	39
III.4.3 Mesure de la concentration en PQ.....	39
III.4.4 Techniques de génotypage de <i>P. falciparum</i> .....	40
<b>III.5 CONSIDERATIONS ETHIQUES</b> .....	<b>45</b>
<b>III.6 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES</b> .....	<b>45</b>
<b>IV RESULTATS</b> .....	<b>47</b>
<b>IV.1 SELECTION DES POLYMORPHISMES DE RESISTANCE DE <i>P. FALCIPARUM</i> PAR AL, AQ-SP ET NON PAR LA DHA-PQ</b> .....	<b>47</b>
IV.1.1 Profils des études et caractéristiques des populations .....	47

IV.1.2	Sélection de polymorphismes de gènes de résistance dans les parasites de nouvelles infections dans l'étude randomisée comparant AL, AQ-SP et DHA-PQ.....	51
IV.1.3	Sélection de polymorphismes de gènes de résistance dans les parasites des nouvelles infections après traitement à la DHA-PQ .....	52
IV.1.4	Sélection de polymorphismes de gènes de résistance de <i>P. falciparum</i> sous l'effet de la chimioprévention saisonnière du paludisme au Burkina Faso.....	53
<b>IV.2</b>	<b>EFFICACITE ET PHARMACOCINETIQUE DE LA DHA-PQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME SIMPLE AU BURKINA FASO .....</b>	<b>54</b>
IV.2.1	Efficacité du traitement à la DHA-PQ.....	54
IV.2.2	Association entre la concentration plasmatique en PQ et la réponse au traitement à la DHA-PQ .....	56
IV.2.3	Relation entre la présence des marqueurs de résistance et les recrudescences.....	58
IV.2.4	Clairance de la fièvre et des parasites, portage de gamétocytes et variation moyenne de l'hémoglobine .....	58
IV.2.5	Tolérance et acceptabilité du traitement à la DHA-PQ .....	59
<b>V</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>V.1</b>	<b>DE LA SELECTION DES POLYMORPHISMES DE RESISTANCE DE <i>P. FALCIPARUM</i> PAR AL, AQ-SP ET NON PAR LA DHA-PQ.....</b>	<b>60</b>
<b>V.2</b>	<b>DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE LA DHA-PQ ET DE LA PHARMACOCINETIQUE DE LA PQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME SIMPLE AU BURKINA FASO .....</b>	<b>65</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>67</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>68</b>
<b>ARTICLE NUMERO 1</b>	<b>.....</b>	<b>79</b>
<b>ARTICLE NUMERO 2</b>	<b>.....</b>	<b>86</b>
<b>ARTICLE NUMERO 3</b>	<b>.....</b>	<b>93</b>

# I INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose due à un parasite du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre de la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est l'une des plus importantes maladies infectieuses du monde et son contrôle demeure compromis par la propagation de la résistance du parasite aux antipaludiques disponibles (Greenwood *et al.*, 2005). Pour pallier à cette chimiorésistance, l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) a recommandé l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le traitement de paludisme simple (White, 2008a; WHO, 2001). Toutes les CTA résultent de l'association de dérivé d'artémisinine à action rapide et d'un composé à action prolongée. L'utilisation des CTA a comme avantage l'amélioration de l'efficacité des antipaludiques via une destruction massive des parasites infectants grâce à l'action rapide de l'artémisinine et une élimination des parasites récurrents grâce à la longue durée de vie du médicament associé (Adjuik *et al.*, 2002; Olliaro et Mussano, 2003). Malgré la mise en place des combinaisons thérapeutiques par les systèmes de santé, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, même contre les CTA (Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2008; Wongsrichanalai et Meshnick, 2008).

Plusieurs méthodes ont couramment été utilisées pour la surveillance de la chimiorésistance. Avec l'essor de la biologie et la connaissance actuelle du génome de *P. falciparum*, la caractérisation des marqueurs moléculaires est de nos jours introduite dans les méthodes d'évaluation et de surveillance de l'efficacité des antipaludiques. Ainsi, la résistance à la chloroquine (CQ) a été principalement associée à la mutation 76T au niveau du gène *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquino-resistance transporter) (Djimde *et al.*, 2001; Fidock *et al.*, 2000) et un certain nombre de mutations au niveau gène *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1) contribueraient au phénotype résistant, notamment la mutation 86Y dont la présence semble être liée à celle de *pfcr1* 76T (Tinto *et al.*, 2003). Ces mêmes polymorphismes sont associés à la résistance à l'amodiaquine (AQ) (Tinto *et al.*, 2008), une amino-quinoléine structurellement proche de la CQ. Cependant, l'AQ demeure efficace contre certaines souches chloroquino-résistantes et il semble que les mutations *pfmdr1* jouent un rôle plus important dans cette résistance que dans celle de la chloroquine (Dokomajilar *et al.*, 2006b; Happi *et al.*, 2006; Ochong *et al.*, 2003; Roepe, 2009). Pour la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), plusieurs marqueurs de résistances ont été identifiés au niveau des gènes *P. falciparum* dihydrofolate reductase (*Pfdhfr*) et *P. falciparum* dihydropteroate synthase

(*Pfdhps*) avec notamment la triple mutation au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr* et la double mutation 437 et 540 du gène *Pfdhps* (Gregson et Plowe, 2005; Kublin *et al.*, 2002). La pipéraquline (PQ) est une bi-quinoléine qui a été largement utilisée en monothérapie en Chine entre 1970 et 1980 et en conséquence, des résistances clinique et *in vitro* de cette molécule ont été rapportées (Davis *et al.*, 2005). L'apparition récente de phénotype résistant à l'artémisinine dans les frontières Thaï-Cambodgiennes (Denis *et al.*, 2006; Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2009) suscite de nos jours de nouvelles inquiétudes pour le contrôle du paludisme, menaçant de ce fait tous les efforts de contrôle et d'élimination de la maladie. Des mutations au niveau de plusieurs gènes candidats ont été associées à la résistance *in vitro* de l'artémisinine. Très récemment, Arieu et ses collaborateurs ont identifié un marqueur de résistance à l'artémisinine en établissant une forte corrélation entre la présence des mutations du gène « *K13-propeller* », la survie *in vitro* des parasites et la clairance parasitaire *in vivo* (Arieu *et al.*, 2014). Les mécanismes moléculaires de la résistance à la PQ demeurent cependant encore inconnus.

L'évaluation du polymorphisme de gènes conférant la résistance des parasites récurrents à la suite d'un traitement antipaludique est l'une des méthodes les plus sensibles permettant d'identifier la sélection précoce des souches de parasites présentant une diminution de sensibilité aux antipaludiques. De telles études en Afrique ont en effet montré que la CQ (Djimde *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002), l'AQ (Dokomajilar *et al.*, 2006b; Holmgren *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2007; Humphreys *et al.*, 2007) et les combinaisons à base d'AQ (Djimde *et al.*, 2008; Holmgren *et al.*, 2007; Nsobya *et al.*, 2007) sélectionnent les mutations de résistance au niveau des gènes *pfprt* et *pfmdr1*, et que l'artéméthéroluméfantine (AL) sélectionne les types sauvages de ces mêmes loci (Dokomajilar *et al.*, 2006a; Humphreys *et al.*, 2007; Martensson *et al.*, 2005; Zongo *et al.*, 2007b). Pour la SP ou les combinaisons thérapeutiques à base de SP la sélection des polymorphismes de résistance se situe au niveau des gènes *pfdhfr* et *pfdhps* (Djimde *et al.*, 2008; Dokomajilar *et al.*, 2006b; Tinto *et al.*, 2007; Zongo *et al.*, 2007b). La DHA-PQ est l'une des CTA ayant montré une excellente efficacité en Afrique (Kamya *et al.*, 2007; Zongo *et al.*, 2007a). L'intérêt de cette étude résulte du fait que très peu d'études ont évalué l'efficacité et la sélection des marqueurs de résistance sous la pression médicamenteuse de la DHA-PQ au Burkina Faso. Le présent travail a donc pour buts d'évaluer l'effet des pressions médicamenteuses de AL, AQ-SP et DHA-PQ sur le polymorphisme de gènes conférant la résistance de *P. falciparum* et d'évaluer l'efficacité thérapeutique de trois antipaludiques, ainsi que d'analyser la pharmacocinétique au jour 7 de la PQ dans le traitement du paludisme simple.

## **II GENERALITES**

### **II.1 LE BURKINA FASO**

#### **II.1.1 Situation géographique du Burkina Faso**

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest avec une superficie de 274200 km<sup>2</sup>. Il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, au Nord-Est par le Niger, au Sud-Est par le Bénin et au Sud par la Côte d'Ivoire, le Ghana et le Togo.

#### **II.1.2 Données environnementales et climatiques du Burkina**

Plusieurs facteurs environnementaux et climatiques influençant la prolifération des vecteurs sont associés à l'endémicité du paludisme. Ces facteurs sont la pluviométrie, la température et le couvert végétal. Le Burkina Faso est sous un climat tropical de type soudanien dans lequel alternent une longue saison sèche (octobre à avril) et une courte saison humide (mai à septembre). La durée de la saison des pluies et la pluviométrie totale annuelle permettent de distinguer trois zones climatiques :

- Une zone soudanienne, plus arrosée avec une pluviométrie comprise entre 1000 et 1300 mm d'eau sur une période qui s'étale sur au moins 5 mois. La végétation est composée de forêts claires et de galeries forestières en bordure de cours d'eau permanents ;
- Une zone soudano-sahélienne recevant une pluviométrie comprise entre 600 et 1000 mm d'eau sur une période d'environ 4 à 5 mois. La végétation est une juxtaposition de formations arbustives et herbeuses ;
- Une zone sahélienne caractérisée par une pluviométrie annuelle comprise entre 400 et 600 mm d'eau sur une période de 3 à 4 mois. La bande sahélienne est caractérisée par une steppe arborée de balanite et d'Acacias radia avec un tapis de graminées sur les dunes et le long des dépressions.

Le réseau hydrographique du Burkina s'organise en trois bassins qui drainent annuellement environ 8 milliards de mètre cube d'eau. Ce sont :

- le bassin de la Volta constitué par trois sous-bassins majeurs que sont : le Mouhoun, du Nakambé et de la Pendjari ;
- le bassin de la Comoé et le bassin du Niger.



Les trois principaux cours d'eau sont : le Mouhoun (anciennement Volta Noire), le Nakambé (Volta Blanche) et le Nazinon (Volta Rouge). Le Mouhoun est le seul fleuve permanent du pays avec la Comoé qui coule au sud-ouest. De nombreuses mares temporaires et permanentes existent par ailleurs sur l'ensemble du territoire mais ne sont pas répertoriées. Il existe également des barrages hydroélectriques (entre autres ceux de Bagré, de la Kompienga, du Sourou, de Samandeni) aux abords desquels des aménagements agricoles et maraîchers ont été réalisés. Ces mares et aménagements sont souvent sources de prolifération des vecteurs dont l'anophèle responsable de la transmission du paludisme (Guinko, 1984).

### **II.1.3 Les faciès de transmission du paludisme au Burkina Faso**

On distingue trois faciès de transmission du paludisme au Burkina Faso (figure I)

- Un faciès de transmission permanente au Sud-Ouest du pays dans lequel la transmission commence en Mai
- Un faciès de transmission saisonnière longue au centre dans lequel la transmission commence en Mai et dure de 4-6 mois
- Un faciès de transmission saisonnière courte au nord du pays d'une durée de 2-3 mois avec des risques potentiels d'épidémies de paludisme.

Le paludisme demeure au Burkina Faso, le principal motif de consultation et d'hospitalisation ainsi que la première cause de mortalité. En effet, en 2011, le paludisme représentait respectivement 45,4%, 52,5% et 34,2% des consultations, hospitalisations et décès dans les formations sanitaires de districts au Burkina Faso. En terme de vulnérabilité, les enfants de moins de 5 ans représentent la population la plus à risque avec plus de 50 % en 2011 des cas de consultations, 80,38% des cas d'hospitalisations et environ 87,9% des cas de décès enregistrés dans les formations sanitaires de districts (Santé, 2011b).

## Burkina Faso: Duration of the Malaria Transmission Season

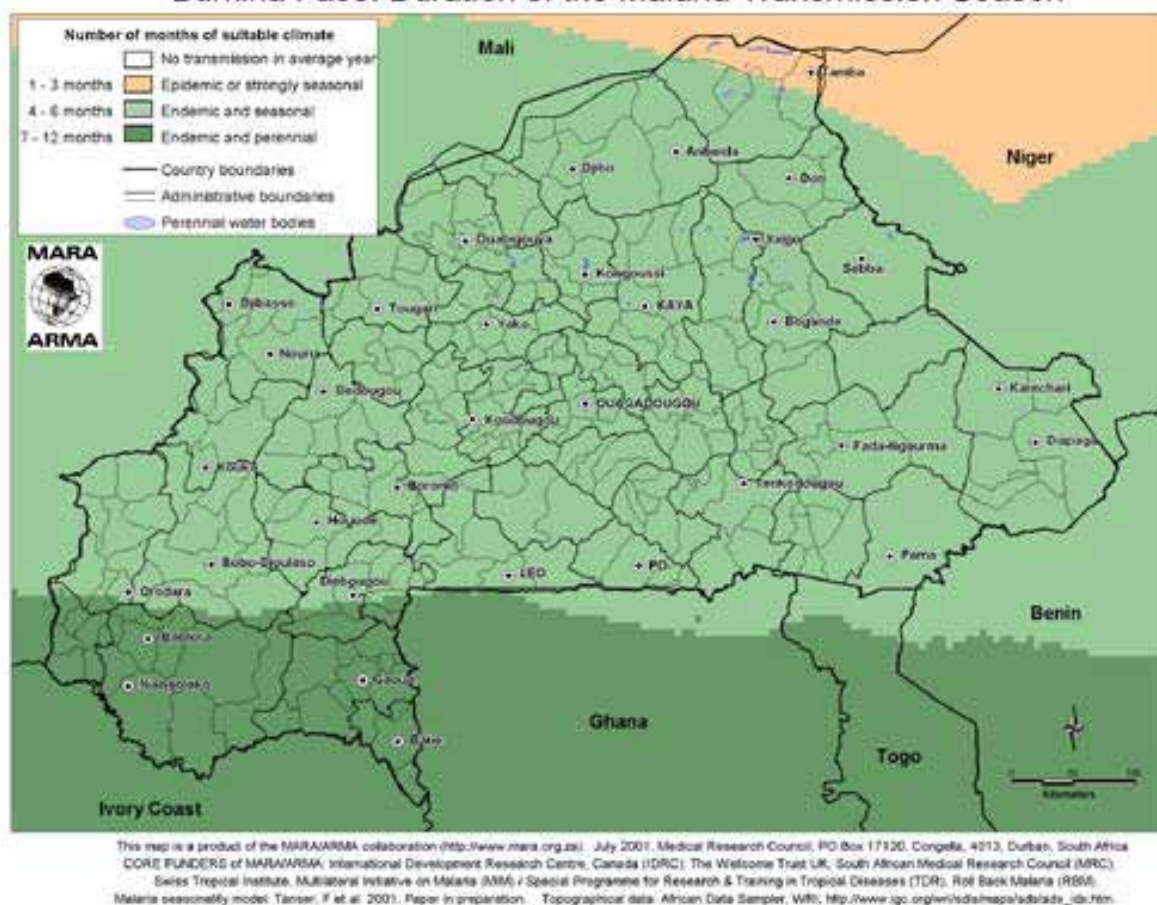


Figure I : Faciès de transmission du paludisme au Burkina Faso (Source : MARA/ARMA)

## II.2 LE PALUDISME

### II.2.1 Historique du paludisme

Le paludisme (du latin *palus, paludis, marais*), ou malaria (de l'italien *mal'aria*, mauvais air), est une parasitose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui sévit depuis la haute antiquité. Les connaissances sur le paludisme et le développement de la lutte antipaludique se sont acquises sur quatre principales périodes. La période empirique s'étend de la création de l'homme jusqu'en 1880, date de la découverte des parasites responsables du paludisme par Laveran à Constantine. La période naturaliste (de 1880 jusqu'à la seconde guerre mondiale) et la période chimique sont marquées par un développement considérable des opérations de lutte antipaludiques ayant contribué significativement à la régression de la maladie partout dans le monde. La période actuelle correspond à celle du changement de stratégie de lutte à partir de 1970 suite à la profonde désillusion de la stratégie d'éradication. Les principales dates de l'histoire des découvertes sur le paludisme dans le monde se résument comme suit :

- **Premier millénaire avant Jésus-Christ** : les propriétés antipaludiques de *Artemisia annua* sont utilisées en Chine.
- **Cinquième siècle avant Jésus-Christ** : Hippocrate décrit les fièvres tierces bénignes et quarte en Grèce
- **1600** : Juan Lopez, un jésuite fut guéri avec la poudre de quinquina par un tradipraticien Indien, Pedro Liva, en Equateur.
- **1643** : Le cardinal Juan de Lugo conduisit un essai du produit péruvien à l'hôpital Santo-Spirito de Rome
- **1649** : Utilisation de l'écorce de quinquina adoptée par les jésuites
- **1712** : Torti séparait les fièvres qui cèdent à la quinine de celles qui y résistent
- **1820** : Caventou et Pelletier isolaient la quinine et la quinidine.
- **1822** : la quinine fut utilisée par les français au Sénégal
- **1854** : la Quinine fut distribuée comme prophylaxie aux ouvriers des chemins de fer aux Etats-Unis
- **1880** : Alphonse Laveran découvrit et décrit les parasites du paludisme dans le sang.
- **1885** : Ross découvrit le rôle des oocytes en Italie
- **1886** : Golgi décrit *P. vivax* et *P. malariae*
- **1889-1890** : Celli et Marchiafava décrivent *P. falciparum*
- **1922** : Stephens décrit *P. ovale*
- **1934** : Découverte de la chloroquine
- **1935-39** : Pulvérisations domiciliaires de pyrèthrine en Afrique du Sud
- **1936-39** : Découverte et utilisation des propriétés insecticides du DDT
- **1953** : Apparition de la résistance des anophèles aux insecticides
- **1955** : Lancement du programme global d'éradication
- **1960-1966** : développement de la sulfadoxine-pyriméthamine
- **1961** : Apparition de la résistance aux médicaments en Amérique latine, en Asie du Sud et au Cambodge
- **1969** : L'OMS révisa les stratégies de lutte contre le paludisme
- **1985** : utilisation des moustiquaires imprégnées
- **1985** : développement de l'artémisinine
- **1992** : conférence ministérielle sur la stratégie de lutte antipaludisme à Amsterdam en Hollande

- **1995** : lancement du programme «faire reculer le paludisme»(Bruce-Chwatt *et al.*, 1993).

Au Burkina Faso, les principales dates ayant marquées la lutte antipaludique sont :

- **1941** : début des études épidémiologiques dans la région de Bobo-Dioulasso
- **1947** : création d'une section Paludisme au sein du Service Général d'Hygiène Mobile et de Prophylaxie chargée du programme d'éradication et de la chimio-prophylaxie de masse;
- **1972-1974** : introduction de la chimio-prophylaxie avec la CQ chez les enfants de moins de 5 ans et chez les femmes enceintes pendant la période de transmission intense ;
- **1979** : intégration du traitement présomptif à la dose de 10 mg/kg de chloroquine de tout accès fébrile et de la chimio-prophylaxie chez la femme enceinte suite aux études du Centre Muraz ;
- **1982** : création du Réseau Ouest Africain de Traitement antipaludiques
- **1984 à 1985** : mise en œuvre d'un programme de lutte anti-vectorielle à Ouagadougou ;
- **1985** : création du centre de Référence de la Chimiosensibilité du Paludisme (CRCP) au Centre Muraz ;
- **1987** : création du Centre National de Lutte contre le Paludisme (CNLP) assurant la coordination des activités de contrôle de l'endémie au Burkina
- **1988** : détection de foyers de chimiorésistance et révision de la posologie du traitement par la chloroquine à 25 mg/Kg de poids ;
- **1991** : adoption d'un schéma thérapeutique standard pour le traitement du paludisme et création du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) ;
- **1993-1995** : expérimentation et présentation des résultats encourageants sur l'imprégnation des rideaux et des moustiquaires ;
- **1995** : restructuration du PNLP dans le cadre de la politique nationale de lutte contre le paludisme ;
- **1996** : adoption de la Prise en Charge Intégrée des Maladies de l'Enfant (PCIME) ;
- **1997-1998** : lancement de l'initiative Africaine de lutte contre le paludisme au XXIe siècle par l'OUA et mise en œuvre du Programme d'Accélération de la Lutte Antipaludique (PALAP) ;
- **1998** : lancement du programme «Faire Reculer le Paludisme (FRP)» ;

- **1999** : restructuration du CNLP en Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP);
- **2002** : lancement officiel de l'initiative FRP au Burkina Faso à partir de Koupèla, élaboration du premier plan stratégique de lutte contre le paludisme et approbation de la requête du Burkina au financement du Fonds Mondial Série 2 volet paludisme ;
- **2003** : confirmation du phénomène de chimiorésistance à la chloroquine (26,9% à 63,3%) et à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (10%) ;
- 2003 : création du reseau d'Afrique de l'Ouest pour le Traitement Antipaludique (RAOTAP) dont le siege au Centre Muraz de Bobo-Dioulasso
- **Février 2005** : révision et adoption d'une nouvelle politique thérapeutique avec introduction des CTA et du TPI à la Sulfadoxine-Pyriméthamine chez la femme enceinte et élaboration du deuxième plan stratégique de lutte contre le paludisme et son plan intégré de communication ;
- **2007** : disponibilité effective des CTA dans les formations sanitaires et nouvelle approbation de la requête du Burkina à la série 7 du fonds mondial
- **2008** : lancement de la stratégie de prise en charge à domicile (PECADO) du paludisme dans 3 districts sanitaires (Kaya, Saponé, Nouna) ;
- **2009** : introduction des TDRs pour le diagnostic du paludisme dans les CSPS et mise en œuvre de la requête à la série 8 du Fonds Mondial et campagne de distribution universelle de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) dans un district pilote (Diébougou) ;
- **2010** : passage à l'échelle de la PECADO, première campagne nationale de distribution universelle des MILDA et début de la campagne de pulvérisation intradomiciliaire (PID) dans un district pilote (Diébougou) ;
- **Février 2010** : révision des modules de formation prenant en compte la confirmation de tous les cas de paludisme dans les formations sanitaires ;
- **2010** : couverture universelle de la population en moustiquaires imprégnées d'insecticide(Santé, 2011a).

## II.2.2 Les vecteurs du paludisme

Le vecteur du paludisme est la femelle d'un moustique hématophage appartenant à l'ordre des Diptères, de la famille des *Culicidae*, de la sous-famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles*. Il existe environ 500-600 espèces d'anophèles mais seulement 70 à 80

d'entre elles sont vectrices de parasites (dont *Plasmodium*) à l'homme (Boete, 2009; Pages *et al.*, 2007). Ces vecteurs sévissent principalement en Afrique sub-saharienne, en Asie et dans les régions néo-tropicales. Au Burkina Faso, les principaux vecteurs du paludisme couramment rencontrés sont *Anophèles gambiae s.l.*, *Anopheles. funestus s.l.*, (Costantini *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 1986) *Anopheles moucheti* (Gentilini, 1993).

## **II.2.3 Les plasmodies**

### **II.2.3.1 Taxinomie et morphologie du *Plasmodium***

Les plasmodies sont des protozoaires appartenant au règne des protistes (sous *Alveolata* sous *Eukaryota*), au *Phylum* des organismes parasites obligatoires, les *Apicomplexa* (anciennement Sporozoa, « capables de germer d'autres cellules ») et à l'ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. En terme morphologique, les *Apicomplexa* se caractérisent par la présence d'un complexe apical qui leur permet de pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte. Les hémosporidies sont toutes caractérisées comme l'indique leur nom par leur présence dans le sang des vertébrés. Elles ont toutes deux hôtes : un hôte vertébré chez lequel se passe la reproduction asexuée (hôte intermédiaire), et un hôte invertébré, un insecte piqueur chez lequel se passe la reproduction sexuée (l'hôte définitif).

### **II.2.3.2 Les principales espèces de *Plasmodium* et leurs répartitions**

Il existe environ 140 espèces de *Plasmodium* inféodées à diverses espèces animales mais seulement 5 espèces sont pathogènes pour l'homme (Bruce-Chwatt *et al.*, 1993): les 4 anciens connus sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* qui diffèrent entre elles par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. Récemment, *Plasmodium knowlesi*, généralement retrouvé dans la nature chez les singes macaques, a été identifié comme étant la cinquième espèce de *Plasmodium* causant le paludisme dans les populations humaines en Asie du Sud-est (Bronner *et al.*, 2009; White, 2008b).

#### **a) *Plasmodium falciparum***

Il est largement distribué dans la ceinture tropicale du globe : Afrique subsaharienne avec une forte prédominance, Amérique du Sud, et Asie du Sud-Est (Hay *et al.*, 2009). Il est responsable de la fièvre tierce maligne et présente des particularités biologiques :

- Au niveau du foie : *P. falciparum* évolue successivement des stades trophozoïte, mérozoïte, schizonte jeune jusqu'au schizonte exo-érythrocytaire mature. Cette évolution se fait sans interruption car *P. falciparum* ne présente pas de réviviscence schizogonique (reprise de la multiplication des schizontes après une phase d'interruption).
- Au niveau du sang, la schizogonie de *P. falciparum* se déroule dans les capillaires viscéraux où les hématies parasitées sont séquestrées du fait de leur adhérence à l'endothélium. Chaque schizogonie dure 48 heures et conduit à la destruction du globule rouge hôte et à la libération de nouveaux mérozoïtes.

#### **b) *Plasmodium malariae***

Il se développe sous les tropiques comme en zone tempérée mais aujourd'hui sa distribution est sporadique et surtout tropicale. A la phase hépatique, la multiplication asexuée par schizogonie de *P. malariae* est plus lente que celle de *P. falciparum*. C'est l'agent responsable de la fièvre quarte bénigne ou fièvre quartane (accès fébriles survenant tous les quatre jours). L'espèce *P. malariae* peut causer à la longue des lésions rénales graves pouvant évoluer vers l'insuffisance rénale.

#### **c) *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax***

*Plasmodium ovale* est essentiellement observé en Afrique tropicale mais aussi en Asie du Sud-Est tandis-que *P. vivax* sévit en zone tropicale et subtropicale (surtout Amérique du centre et du Sud, Asie du Sud-Est, Afrique de l'Est, Proche et Moyen-Orient). Ces deux espèces diffèrent de *P. falciparum* en ce sens que :

- au cours de la phase hépatique, une partie des trophozoïtes évoluent directement jusqu'aux schizontes matures. Les autres trophozoïtes ont une schizogonie tissulaire retardée et à déclenchement périodique expliquant l'existence des rechutes à long terme, responsables des accès de réviviscence schizogonique.
- la schizogonie sanguine s'effectue dans des vaisseaux de gros calibres, et détermine de façon générale des accès sans gravité. Ces deux espèces sont responsables de la fièvre tierce bénigne (accès fébriles apparaissant tous les trois jours).

Des quatre espèces de *Plasmodium*, *P. falciparum* représente l'espèce la plus redoutable à l'origine des formes graves du paludisme notamment chez les enfants de moins de 5 ans.

### II.2.3.3 Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum*

Le cycle évolutif de *Plasmodium* est un processus complexe comportant deux phases : une phase sexuée qui se déroule chez l'insecte vecteur, l'anophèle femelle et une phase asexuée observée chez l'hôte intermédiaire vertébré. La figure « II » ci-dessous résume le cycle biologique de *Plasmodium falciparum*.

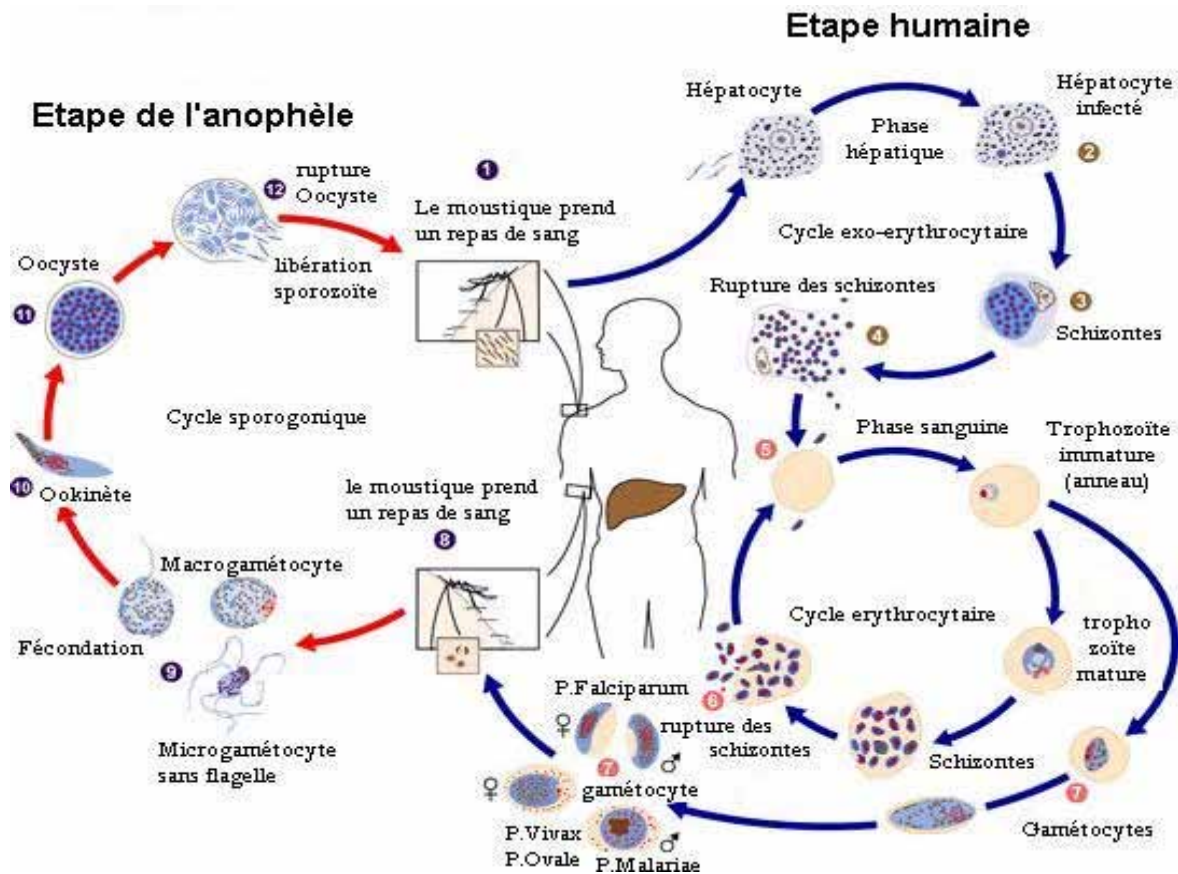


Figure II: Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum*

Source : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

#### a) La phase asexuée

Elle débute chez l'homme avec l'inoculation des sporozoïtes lors de la piqûre de l'anophèle femelle et est caractérisée par la multiplication asexuée du parasite par schizogonie. On distingue deux types de schizogonie que sont la schizogonie exo-érythrocytaire et la schizogonie endo-érythrocytaire.

##### i) La schizogonie exo-érythrocytaire

Pendant son repas sanguin, l'anophèle femelle infesté inocule à l'homme des sporozoïtes représentant la forme infectante du parasite. Le nombre de sporozoïtes inoculés est estimé entre 20 et 200 (Yamauchi *et al.*, 2007). Ces sporozoïtes, issus d'un processus complexe de développement chez le moustique restent environ une demi-heure dans la peau,



la lymphe et le sang. Au cours de leur migration vers le foie, beaucoup de sporozoïtes sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les cellules du foie (Figure III). Dans les hépatocytes, les sporozoïtes se multiplient et évoluent en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » après une à deux semaines de maturation. Ces schizontes éclatent et libèrent dans le sang (figure IV) des milliers de mérozoïtes variant selon l'espèce qui initieront la phase érythrocytaire. La schizogonie hépatique est unique dans le cycle du fait que les hépatocytes ne peuvent être infectés que par des sporozoïtes (Prudencio *et al.*, 2006; Tardieux et Menard, 2008). L'invasion des hépatocytes se fait soit à travers la membrane plasmique ou soit par la formation d'une vacuole essentielle à sa différenciation (Silvie *et al.*, 2004). Des travaux scientifiques montrent que l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes est régulée par l'interaction entre la «Circumsporozoïte Protein» ou CSP (protéine majeure exprimée à la surface des sporozoïtes), la «Thrombospondin-Related Anonymous Protein» (TRAP) exprimée également à la surface des sporozoïtes, les CD81 (tétraspanine), les « cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites » (CelTOS), et les glycosaminoglycanes (GAG) des sinusoides hépatiques (Silvie *et al.*, 2008). Des études *in vitro* ont montré qu'un changement de température est nécessaire pour l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes (Siau *et al.*, 2008). Chez les espèces telles que *P. ovale* et *P. vivax*, certains sporozoïtes peuvent rester quiescents dans les hépatocytes sans se transformer en corps bleu donnant ainsi naissance à des hypnozoïtes responsables des accès de reviviscence tardif (Mazier, 1991). Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure de 8 à 15 jours selon les espèces (de Gentile, 2008).

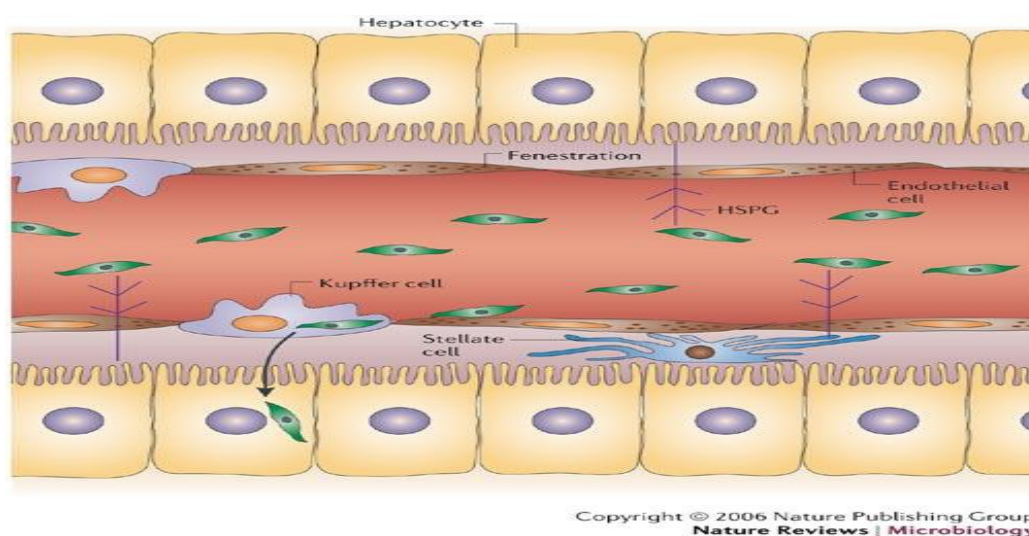
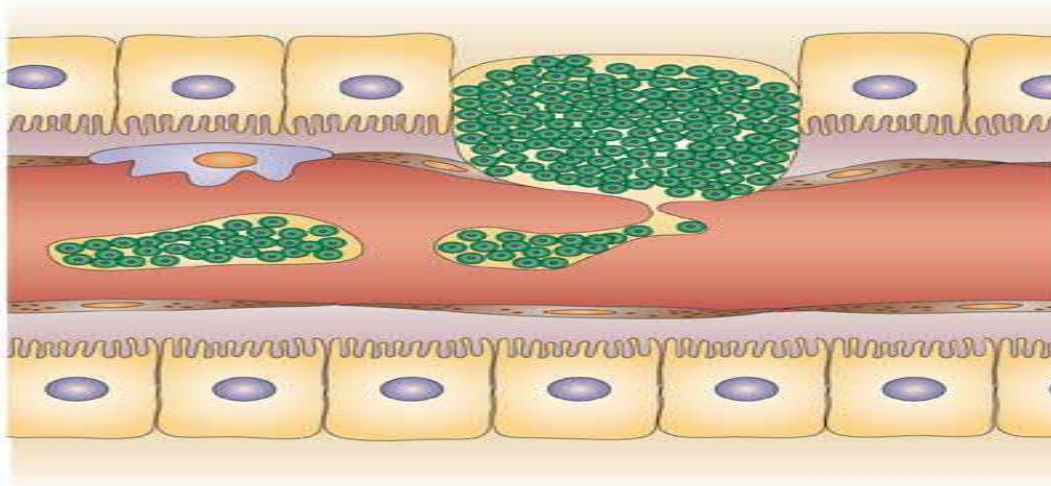


Figure III : Invasion des hépatocytes par *Plasmodium falciparum* (Prudencio *et al.*, 2006)



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Microbiology

**Figure IV : Libération des mérozoïtes hépatiques dans la circulation sanguine (Prudencio *et al.*, 2006)**

#### ii) La phase de schizogonie endo-érythrocytaire

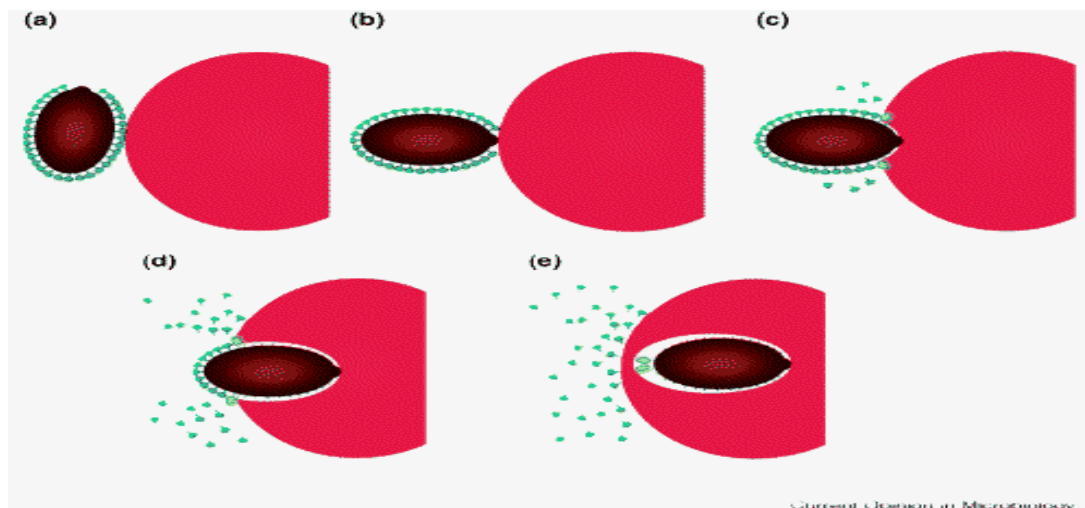
La phase érythrocytaire est initiée par l'invasion aléatoire des hématies saines par des mérozoïtes libérés suite à la rupture des schizontes hépatiques (Tamez *et al.*, 2009). C'est un processus complexe faisant intervenir de multiples interactions entre ligands et récepteurs. L'invasion des hématies qui se fait grâce à un processus d'endocytose dure environ 30 secondes et se passe en cinq phases :

- a) la phase de contact entre le manteau glycoprotéique du mérozoïte (Merozoite Surface Protein 1 pour MSP1) et la surface de l'hématie ;
- b) la phase de réorientation de la région apicale du mérozoïte au contact de la membrane de l'hématie ;
- c) la phase de libération d'une sérine protéase « merozoite surface sheddase (MESH ; en vert sur la figure) suivie de l'amorce de l'invagination de l'hématie;
- d) la phase d'invagination avec détachement progressif du manteau glycoprotéique
- e) la phase d'endocytose avec formation de la vacuole parasitophore (figure V).

Au sein de la vacuole parasitophore, le parasite se différencie en trophozoïte jeune, puis en trophozoïte âgé. A ce moment commence une phase de réplication de l'ADN donnant naissance au schizonte érythrocytaire. Ce schizonte qui montre après segmentation une forme caractéristique de rosace, libère des mérozoïtes (16 à 32 pour *P. falciparum*, 16 à 20 *P. Vivax*, 8 à 16 pour *P. ovale* et 6 à 12 pour *P. Malariae*) qui réinfectent rapidement de nouvelles hématies saines (Rowe *et al.*, 2009). Cependant, l'infection de l'érythrocyte humain par *Plasmodium vivax* nécessite obligatoirement la présence d'un antigène à la surface des globules rouges appelé, « *Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC)* ». L'interaction

entre *P. vivax* et l'érythrocyte est médiée alors par une protéine de liaison, le «*Duffy–Binding Protein*» (PvDBP) (Chitnis et Sharma, 2008; Rayner, 2009).

Chaque cycle de schizogonie endo-érythrocytaire dure 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*. Seule cette phase sanguine est responsable des manifestations cliniques observées au cours du paludisme. Après plusieurs schizogonies, un petit pourcentage de mérozoïtes ne se multiplient pas après invasion des érythrocytes, mais plutôt, se différencient dans les hématies parasitées en formes sexuées appelées gamétocytes. Ces gamétocytes ne peuvent poursuivre leur développement que s'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin par un anophèle femelle (Prudencio *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2009).

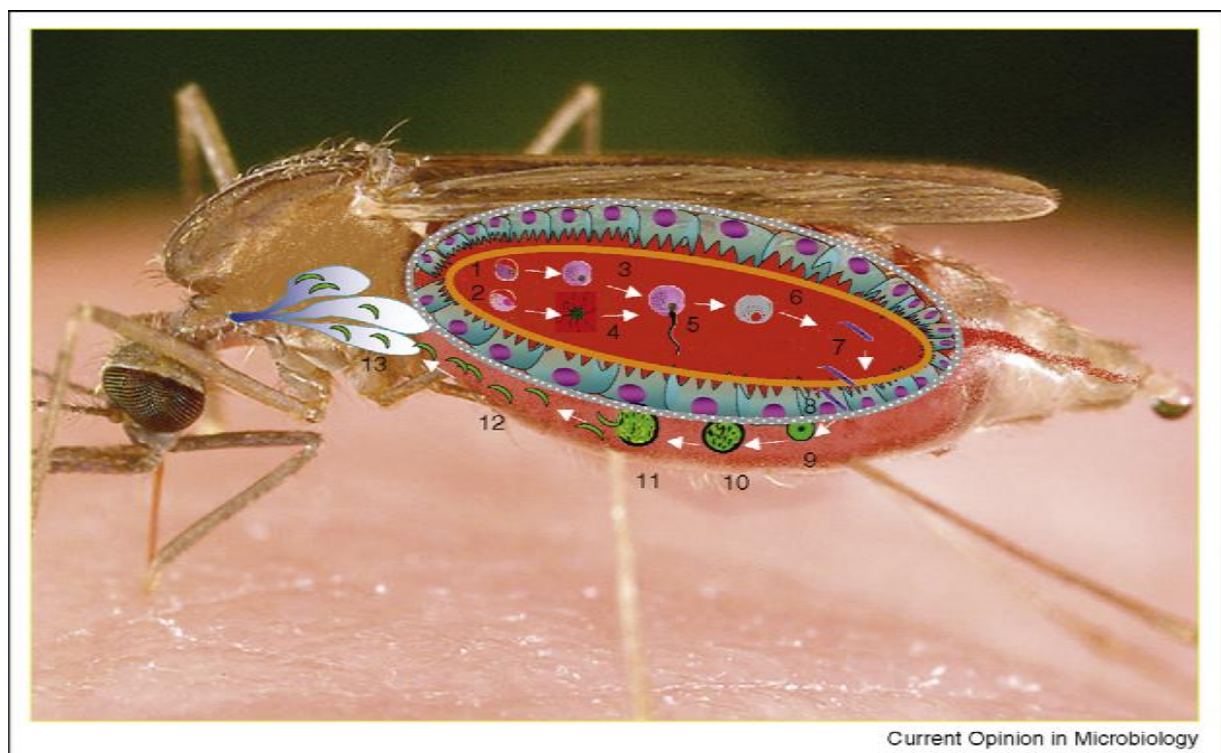


**Figure V : Invasion des érythrocytes par des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* (O'Donnell *et al.*, 2006). (a) : phase de contact, (b) : phase de réorientation, (c) : phase de libération d'une serine protéase, (d) : phase d'invagination, (e) : phase d'endocytose.**

### **b) La phase sexuée**

La transmission de *Plasmodium* à son hôte définitif nécessite son développement chez le vecteur (Dinglasan *et al.*, 2007). La phase sexuée où, le parasite passe par plusieurs stades de développement successifs se déroule chez les femelles de certaines espèces d'anophèle (figure VI). Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère les différents stades du parasite. Les éléments asexués sont digérés dans l'estomac du moustique. Seuls les gamétocytes mâles (micro-gamétocytes) et femelles (macro-gamétocytes) poursuivront leur développement (étapes 1 et 2, figure VI). Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes (étapes 3 et 4, figure VI). Le gamète mâle subit un processus d'ex-flagellation (étape 4 figure 6) à la suite duquel les gamètes

femelles sont fécondés (étape 5, figure VI). Il en résulte un zygote appelé ookinète (étapes 6 et 7, figure 6). Environ 24 heures après la formation du zygote, l'ookinète mature traverse d'abord la matrice péri-trophique (ligne orange ovalaire au sein du moustique), puis l'épithélium stomacal (étape 8, figure VI) avant de se différencier en oocyste (étape 9, figure VI). Cette phase diploïde est brève et s'achève par une division méiotique suivie de plusieurs mitoses aboutissant au développement de sporoblastes, puis de sporozoïtes après une dizaine de jours (étapes 10 et 11, figure VI). L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments haploïdes (5000 à 10 000 sporozoïtes) mobiles dans l'hémolymphe (étape 12, figure VI) et gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle par leurs propres moyens d'où ils pourront être à nouveau injectés avec la salive lors d'une nouvelle piqûre infestante (étape 13, figure VI). La reconnaissance et l'invasion des glandes salivaires du moustique se fait à travers l'interaction entre les protéines de surface de ces glandes salivaires et la TRAP exprimée à la surface des sporozoïtes (Ghosh et Jacobs-Lorena, 2009; Vlachou *et al.*, 2006). La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours en fonction de la température extérieure et de l'espèce plasmodiale (Pages *et al.*, 2007).



Current Opinion in Microbiology

Figure VI : Cycle sporogonique de *Plasmodium falciparum* chez l'anophèle femelle (Ghosh *et al.*, 2009)

#### II.2.3.4 Structure moléculaire et diversité génétique du *Plasmodium*

Le génome de *P. falciparum* est constitué de 25 à 30 méga bases d'ADN nucléaire, soit approximativement 5000 gènes repartis sur quatorze chromosomes linéaires. Il code pour 43

acides ribonucléiques de transfert (ARNt) représentant l'ensemble des anticodons. Les plus polymorphiques de ces gènes, entre autres les gènes de surface des mérozoïtes sont largement utilisés comme marqueurs génétiques dans les enquêtes épidémiologiques investiguant sur la diversité génétique des souches de *P. falciparum* (Babiker *et al.*, 1997; Snounou et Beck, 1998). Ce sont particulièrement les gènes codant pour des protéines du même nom: *merozoïte surface protein-1 (msp-1)*, *merozoïte surface protein-2 (msp-2)*, *merozoïte surface protein 3 (msp-3)* et le *glutamate-rich protein (glurp)*, *Circumsporozoïte protein (csp) erythrocyte binding antigen-175 (eba-175)*, *apical membran antigen 1 (ama-1)*. D'autres gènes polymorphiques sont également utilisés dans les études moléculaires investiguant les marqueurs de résistances *in vivo* et *in vitro* du *Plasmodium* aux antipaludiques disponibles. Ce sont entre autres les gènes : *P. falciparum multidrug-resistance 1 (pfmdr1)*, *P. falciparum chloroquino-resistance transporter (Pfcr1)*, *P. falciparum Multidrug Resistance-associated Protein (Pfmrp)*, *P. falciparum multidrug transporter (Pfmdt)* *P. falciparum dihydrofolate reductase (pfdhfr)*, *P. falciparum dihydropteroate synthase (pfdhps)*, *P. falciparum Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (pfnhe-1)*, *P. falciparum cytochrome b (Pfcytb)*, *P. falciparum Sarco (endo) plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (Pfserca)*. Plusieurs mécanismes sont évoqués dans le polymorphisme génétique de *P. falciparum*: la duplication génique, la conversion, la translocation, les délétions et les insertions géniques (Kemp, 1992). Aussi, les recombinaisons intragéniques qui se produisent généralement dans les segments répétitifs du gène conduisent à des motifs différant par leur taille d'une souche plasmodiale à une autre (Meyer *et al.*, 2002). En conséquence de ce polymorphisme, les individus au sein de l'espèce et de l'hôte sont différents les uns des autres.

#### **a) Le gène *merozoïte surface protein-1 (msp-1)***

Le gène *msp-1* situé sur le chromosome «9» (Triglia *et al.*, 1992) peut être divisé en 17 blocs plus ou moins conservés entre les souches de *P. falciparum*. Le bloc 2 constitue une exception au dimorphisme car en plus des familles alléliques K1 et MAD20, on trouve fréquemment dans ce bloc une troisième famille d'allèles nommée RO33 (figure VII). Ce gène code pour la synthèse d'une protéine mérozoïtique de surface de grande taille (185-200 KDa) fortement impliquée dans l'invasion de l'érythrocyte.

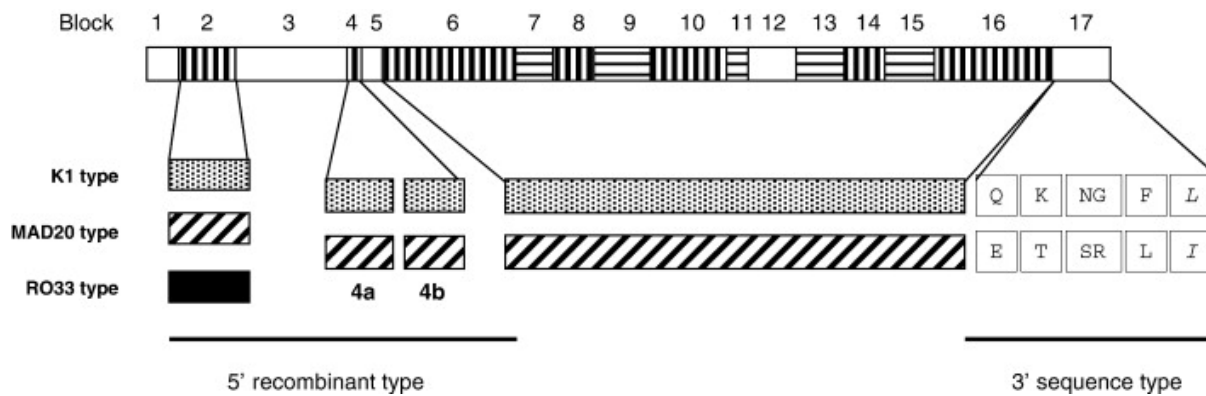


Figure VII : Structure du gène *merozoite surface protein-1* (Sakihama et al. 2007)

### b) Le gène «*merozoite surface protein-2*» (*msp-2*)

Le gène *msp-2*, présent sur le chromosome «2» a été isolé et séquencé (Fenton *et al.*, 1991) à partir de plusieurs souches de *P. falciparum*. Ce gène très polymorphe, code pour la synthèse d'une protéine à la surface du mérozoïte. Il présente une structure en 5 blocs de séquences (figure VIII) comportant 345 résidus acides aminés (A-Elbasit *et al.*, 2007; I.E. *et al.*, 2007) . Les blocs 1, 2, 4 et 5 du gène possèdent une structure stable tandis que le bloc 3 comporte une région variable dimorphique pouvant être classée entre deux familles alléliques sur la base des séquences :

- La famille Indochina 1(IC1 ou 3D7) caractérisée par une courte séquence (Glycine-serine-alanine) répétée de 4 à 8 résidus d'acides aminés.
- La famille FC27 pauvre en glycine-serine-alanine mais contenant une ou plus d'une copie répétée d'une séquence de 32 acides aminés.



Figure VIII : Structure du gène *merozoite surface protein-2* (Ekala *et al.*, 2002)

### c) Le gène *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*(*Pfmdr1*)

Ce gène a été mis en évidence suite à des études sur des cellules cancéreuses multi-résistantes de mammifères. Le gène *Pfmdr-1* est localisé au niveau du chromosome «5» du *P. falciparum*. Il code pour une protéine de 162 KDa connue sous le nom *PfMDR1* ou phg1 (P-glucoprotein homolog 1). Cette protéine située sur la membrane de la vacuole digestive est constituée de 2 blocs homologues comportant chacun six domaines transmembranaires et un domaine conservé de liaison nucléotidique (figure IX) (Duraisingh et Cowman, 2005; Peel, 2001) . Deux allèles de *pfmdr1* ont été identifiés dans des isolats de terrain chloroquino-résistants : l'allèle K1 (contenant le point de mutation N86Y) et 7G8 contenant les mutations

Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y. Des études *in vitro* ont reporté une association partielle entre la mutation N86Y et la chloroquino-résistance (Cooper *et al.*, 2002).

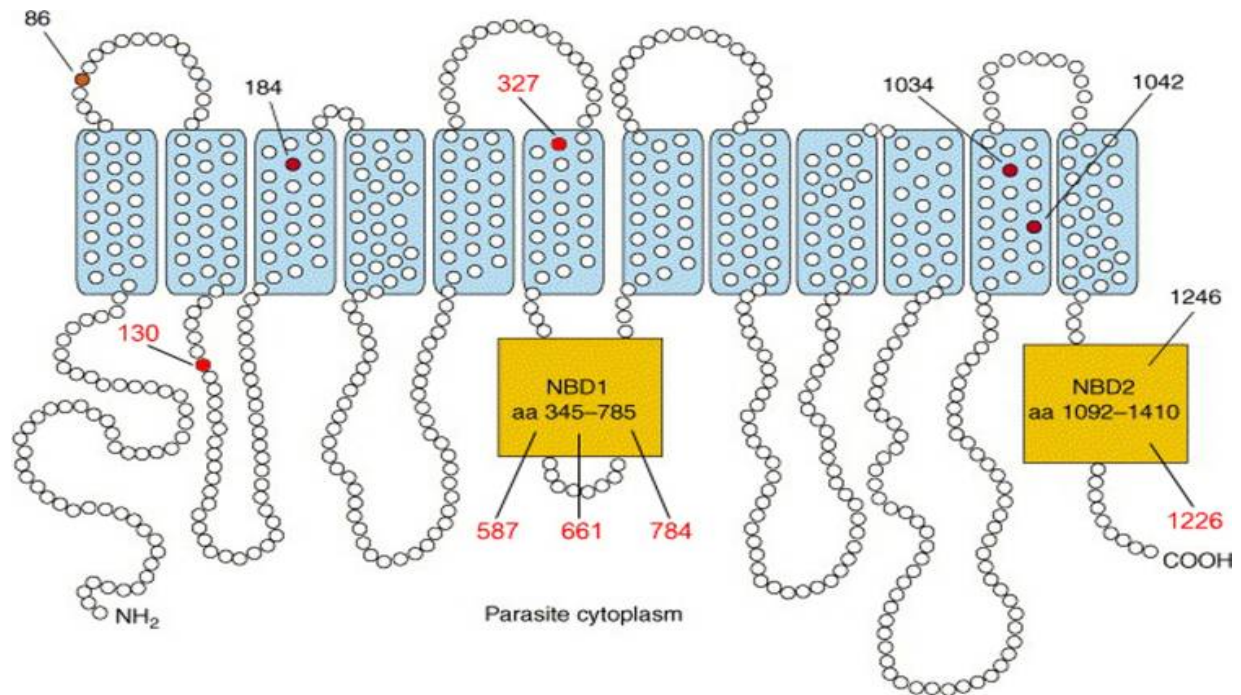


Figure IX : Structure de la protéine PfMDR1 (Cowman, A.F. and S. Karez, 1993).

#### d) Le gène *P. falciparum* chloroquino-resistance transporter

Le gène *pfCRT* a été identifié au niveau du chromosome «7» et code pour une protéine transmembranaire de 45 KDa (PfCRT) située au niveau de la membrane de la vacuole digestive dans laquelle ont lieu non seulement la dégradation, détoxification de l'hémoglobine mais aussi l'accumulation de la chloroquine (Cooper *et al.*, 2002). La protéine PfCRT est constituée de dix domaines transmembranaires (figure X). Des séries de mutations du gène *pfCRT* sont associées à la chloroquino-résistance en Afrique, en Amérique du Sud et en Asie de l'Est (Bray *et al.*, 2005).

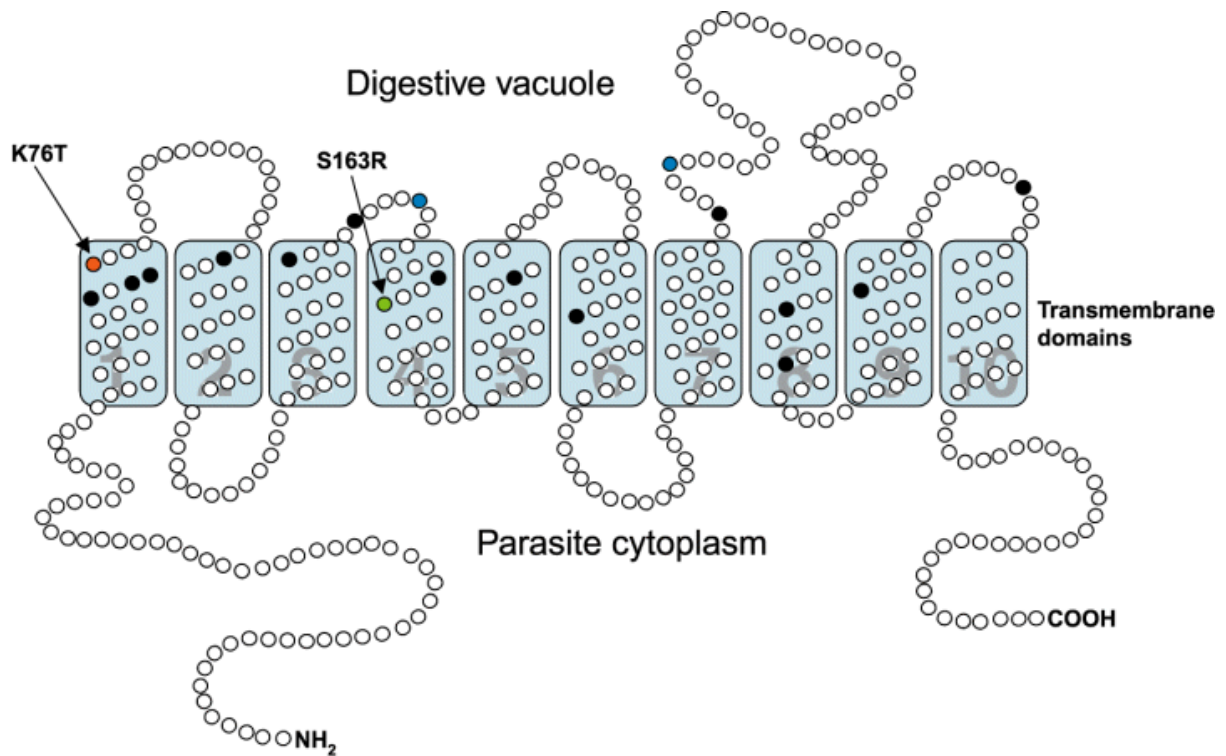


Figure X : Structure de la protéine PfCRT (Bray *et al.*, 2005)

e) Les gènes *P. falciparum dihydrofolate reductase (pfdhfr)* et *P. falciparum dihydropteroate synthase (pfdhps)*

La dihydrofolate réductase (DHFR) et la dihydropteroate synthase (DHPS) sont des enzymes intervenant dans la voie de synthèse du folate de *P. falciparum*. Ces deux enzymes sont respectivement codées par le gène *P. falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (pfdhfr-ts)* situé sur le chromosome «8» et le gène *P. falciparum dihydropteroate synthase (pfdhps)* situé sur le chromosome «4». Des points de mutations spécifiques sont associés à la résistance à la sulfadoxine, à la pyriméthamine et au chlorcycloguanile.

#### II.2.4 Répartition géographique du paludisme dans le monde

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde (World Health Organization., 2010b). La répartition géographique du paludisme est extrêmement variable d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais également au sein d'un même pays. Cette répartition géographique est fortement influencée par la distribution des anophèles vecteurs, la capacité vectorielle, les caractéristiques biologiques des différentes espèces de *Plasmodium*, les conditions climatiques etc. Après avoir sévi presque dans tout le monde entier, le paludisme touche de nos jours environ 97 pays essentiellement les plus pauvres



d’Afrique, d’Asie et d’Amérique. Environ 3,4 milliards de la population mondiale est exposée au risque de paludisme et on estimait à 207 Millions le nombre de cas en 2012 dont 85% dans la région Africaine. Toujours en 2012, environ 627000 décès dus au paludisme ont été enregistrés dont 90% en Afrique au sud du Sahara (WHO, 2013).

La répartition géographique des différentes espèces de *Plasmodium* peut se résumer ainsi (Hay *et al.* , 2009):

- ***P. falciparum*** : est largement distribué dans toute la ceinture tropicale du globe : Afrique subsaharienne, Amérique du sud, et Asie du sud-est.
- ***P. malariae*** : peut se développer sous les tropiques comme en zone tempérée mais aujourd’hui sa distribution est sporadique et surtout tropicale.
- ***P. ovale*** : est essentiellement observé en Afrique tropicale mais il est aussi signalé en Asie du sud-est (Vietnam).
- ***P. vivax*** : sévit en zone tropicale et subtropicale (surtout Amérique du centre et du sud, Asie du sud-est, Afrique de l’est, Proche et Moyen – Orient).

Quant à la cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi* découverte en 2004, elle sévit dans le Sud-Est asiatique. La figure XI ci-dessous donne la cartographie de la distribution mondiale du paludisme en 2011.

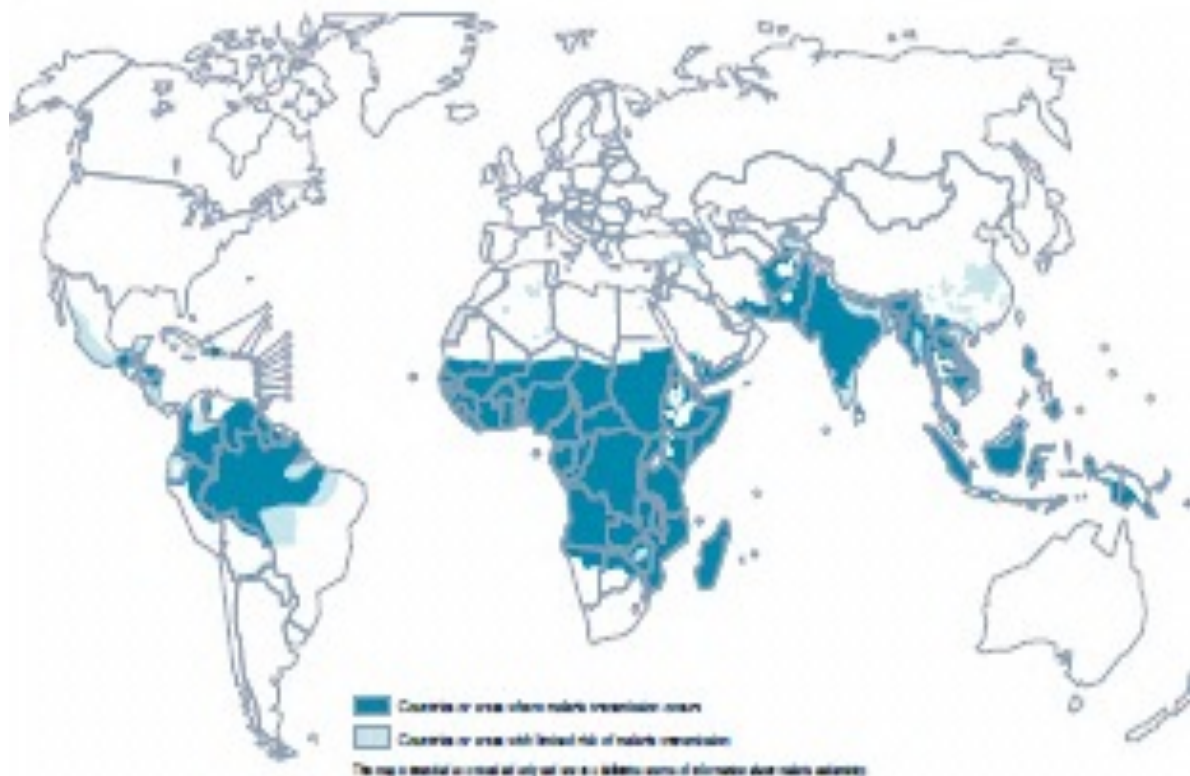


Figure XI : Répartition géographique du paludisme dans le monde (WHO, 2011)

## **II.2.5 Symptomatologie et évolution du paludisme à *Plasmodium falciparum***

### **II.2.5.1 Le paludisme asymptomatique**

Le paludisme asymptomatique se définit comme étant l'absence de manifestations cliniques chez un individu présentant des formes asexuées du parasite à l'examen du sang. Un tel sujet est un porteur sain et constitue un important réservoir du parasite en zone d'endémie. Ce portage asymptomatique peut évoluer à tout moment vers un paludisme clinique simple ou grave.

### **II.2.5.2 Le paludisme simple à *Plasmodium falciparum***

C'est un accès palustre classique sans aucun signe de malignité avec une période d'incubation de 7 à 15 jours (Gentilini, 1993). La phase d'invasion au cours de l'accès palustre simple est caractérisée par une fièvre continue (39°-40°) accompagnée de céphalées, nausées ou vomissements. A la phase d'état, les accès prennent une évolution de type tierce (schizogonies toutes les 48 h). Ces accès sont typiques : fièvre de 39°- 40°, frissons, sueurs accompagnées de céphalées, de vomissements et d'une splénomégalie parfois d'une hépatomégalie. Sous un traitement bien suivi l'évolution de l'accès palustre simple est favorable en quelques jours. Non traité, l'accès peut tout de même guérir après quelques jours de fièvre. Mais à tout moment, le risque d'évolution maligne vers la forme grave est possible. Globalement, les accès simples à *P. falciparum* représentent 90 % des cas de paludisme dus à cette espèce (Gentilini, 1993).

### **II.2.5.3 Le paludisme grave**

Selon l'OMS, le paludisme grave se définit par la présence de formes asexuées des parasites à l'examen microscopique du sang périphérique, associée à une ou plusieurs des manifestations suivantes (WHO, 2000c).

- Altération de l'état de conscience : coma (score de Blantyre < 3) persistant pendant au moins 30 minutes, ne pouvant être rapporté à une autre cause ;
- Convulsions généralisées et répétées ;
- Anémie sévère (normocytaire, hémocrite <15 % ou taux d'hémoglobine <5 g/dl)
- Insuffisance rénale (diurèse <12 ml/kg/24 heures ou créatinine > 265 µmol/l) ;
- œdème aigu du poumon (ou syndrome de détresse respiratoire aiguë) ;
- Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l ou 0,4 g/l) ;
- Collapsus circulatoire ;

- Hémorragie diffuse (ou coagulation intravasculaire diffuse) ;
- Hémoglobinurie massive ;
- Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol /l) ;
- Prostration ou faiblesse extrême ;
- Ictère (clinique ou bilirubine > 50µmol/l ou >30 mg/l).

L'accès palustre grave dû à *P. falciparum* représente la complication la plus redoutable car le taux de létalité lié au paludisme grave est très élevé. Les complications les plus courantes et les plus graves de l'atteinte par *P. falciparum* sont le paludisme cérébral et l'anémie sévère.

Au Burkina Faso, la prévalence du paludisme cérébral est plus élevée en milieu urbain tandis que l'anémie sévère sévit plus fortement en milieu rural (Modiano *et al.*, 1999). Les formes anémiques plus fréquentes en milieu rural constituent en Afrique une importante cause de mortalité chez les enfants (Newton *et al.*, 1997). Dans le cas des accès palustres graves, un traitement d'urgence doit être instauré afin de circonscrire au plus tôt d'éventuelles complications notamment neurologiques.

## **II.2.6 Diagnostic du paludisme**

### **II.2.6.1 Diagnostic clinique**

La reconnaissance des signes cliniques du paludisme est la méthode de diagnostic la plus couramment utilisée en Afrique subsaharienne. Elle est de réalisation peu coûteuse et ne nécessite aucun équipement spécial ou de fournitures (Tangpukdee *et al.*, 2009). Malgré la non spécificité des symptômes du paludisme, l'usage du diagnostic clinique reste néanmoins justifiable dans les endroits qui ne disposent pas de moyens de diagnostic biologique (WHO, 2000b).

### **II.2.6.2 Le diagnostic biologique**

Un diagnostic de certitude d'un accès palustre est apporté par la mise en évidence du parasite dans le sang. L'examen biologique le plus couramment utilisé est la microscopie. Elle consiste en une observation d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin, généralement confectionnés sur la même lame.

#### **a) Le diagnostic microscopique de goutte épaisse /frottis sanguin**

L'examen microscopique de goutte épaisse (GE)/ frottis sanguin (FS) demeure la technique de référence (Gold-standard) préconisée par l'OMS pour un diagnostic de certitude

de l'accès palustre (WHO, 2000a). Il a une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour la détection du *Plasmodium*. Il est peu coûteux en moyens et en réactifs et demeure la technique la plus utilisée. Cependant, ses performances en terme de sensibilité et de fiabilité dépendent directement de l'expérience du microscopiste et du niveau de la parasitémie du sujet infecté (Makler *et al.*, 1998).

La réalisation de la GE consiste à prélever une goutte de sang sur une lame porte-objet. Ce sang sera défibriné immédiatement par un mouvement en spirale à l'aide du coin d'une autre lame. Ce mouvement permet également d'étaler le sang sur une surface d'environ un centimètre de diamètre. Le prélèvement est séché puis coloré, sans fixation préalable, à l'aide d'une solution aqueuse de Giemsa. Après la coloration, seuls les leucocytes et les parasites éventuels resteront sur la lame. La numération se fait en comptant les parasites au nombre de leucocytes.

Le FS consiste en l'étalement mince d'une goutte de sang prélevée sur une lame de verre suivi de la fixation et de la coloration au Giemsa. En plus de la détermination de la densité parasitaire, le FS permet également d'identifier l'espèce de *Plasmodium* en cause à partir des critères morphologiques des parasites et des hématies parasitées. Le seuil de détection du FS est de l'ordre de 100 parasites /  $\mu\text{L}$  (De Gentile et F., 2000) d'où la nécessité d'associer le FS à la GE qui détecte des parasitémies plus faibles de l'ordre de 10 à 20 parasites /  $\mu\text{L}$  (Delaunay *et al.*, 2008).

Le diagnostic microscopique du paludisme, peut être pris à défaut dans les formes pauciparasitaires (cas des voyageurs) et éventuellement dans certains cas d'infection par *P. falciparum*, où les parasites séquestrés dans les capillaires et autres organes profonds ne sont pas assez présents dans le sang circulant (Brenier-Pinchart *et al.*, 2000). Il serait d'une grande nécessité en cas de forte suspicion clinique avec des examens microscopiques négatifs, de répéter le prélèvement sanguin 6 à 12 heures plus tard. Cette attitude ne doit en aucun cas retarder l'initiation d'un traitement spécifique dans un contexte clinique grave. Le diagnostic microscopique peut également se heurter à des difficultés d'identification d'espèce particulièrement en présence de parasites altérés par un traitement présomptif ou en cas de très faibles parasitémies.

#### **b) Les tests de diagnostic rapide (TDRs)**

Les tests de diagnostic rapide (TDRs) du paludisme reposent sur le principe de l'immunochromatographie utilisant des bandelettes sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux (Colin *et al.*, 2000). La

réalisation des TDRs ne nécessite aucun appareillage. Trois principaux groupes d'antigènes parasitaires sont visés par les TDRs :

- Histidin-Rich Protein 2 (HRP-2) spécifiques à *P. falciparum* ; antigène soluble abondant, thermostable présent dans le cytoplasme et sur la membrane des hématies parasitées,
- *P. Lactate Déshydrogénase* (pLDH) spécifique à *P. falciparum* et *P. Vivax*.
- Aldolase (pan-spécifique ; enzyme glycolytique du parasite).

Les TDRs sont d'exécution rapide et de lecture facile pouvant être réalisés par un personnel moyennement formé. Ils sont indiqués particulièrement dans les structures non spécialisées lorsque l'examen microscopique n'est pas disponible (Hance *et al.*, 2005). Leurs performances dépendent essentiellement de la parasitémie (Minodier *et al.*, 2005). Ils sont également moins performants avec les espèces autres que *P. falciparum*, particulièrement *P. ovale* (Grobusch *et al.*, 2002). Les TDRs doivent être considérés comme un complément des autres méthodes diagnostiques. Leurs résultats doivent être vérifiés et complétés si possible par l'examen microscopique. Leur positivité permet une prise en charge adéquate et rapide des patients. En revanche, leur négativité ne doit pas écarter le diagnostic (Hance *et al.* , 2005).

### **c) La sérologie**

La sérologie est basée sur la détection des anticorps antipaludiques spécifiques (IgG ; IgM) dans le sérum des patients. Elle utilise des techniques d'immunofluorescence indirecte et des tests immuno-enzymatiques (ELISA). Des marqueurs sérologiques ont été identifiés pour chacune des quatre espèces de *Plasmodium*. En zone d'endémie palustre, la sérologie n'a pas de place dans le diagnostic des accès palustres aigus en raison de l'apparition tardive des anticorps (AC) antipalustres par rapport à l'émergence des parasites dans le sang. Le diagnostic sérologique se confronte également à des difficultés d'interprétation. En effet, la présence d'AC spécifiques peut témoigner soit d'une infection palustre évolutive soit d'un paludisme antérieur dans la mesure où les AC peuvent persister longtemps après l'infection (Camara *et al.*, 2009). Le diagnostic immunologique est indiqué dans certaines formes cliniques chroniques telles le paludisme viscéral évolutif et la splénomégalie palustre hyper-immune au cours desquelles les AC sont à des concentrations élevées alors que les recherches parasitologiques sont le plus souvent négatives. La sérologie est aussi utile en rétrospectif en cas de traitement présomptif ou d'automédication. Elle reste par ailleurs, très utilisée dans le

dépistage des donneurs de sang dans le cadre de la prévention du paludisme post-transfusionnel et dans les enquêtes épidémiologiques.

#### **d) Les techniques de biologie moléculaire**

Les techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification des gènes par la réaction de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase-chain reaction » pour PCR) sont utilisées dans le diagnostic du paludisme, mais surtout dans la surveillance épidémiologique de la pharmacorésistance du *Plasmodium* (Figueiredo *et al.*, 2008). La PCR demeure la technique la plus sensible qui puisse permettre la détection de très faibles parasitémies de l'ordre de 0,3 parasite/ $\mu$ l avec récemment une possibilité de quantification de l'ADN du parasite grâce à la PCR quantitative (de Monbrison *et al.*, 2003) . Lorsque la PCR est réalisée dans de bonnes conditions, sa valeur prédictive négative est très bonne et sa spécificité absolue (Hanscheid et Grobusch, 2002). Malgré ces nombreux avantages, la biologie moléculaire ne peut remplacer en pratique courante les méthodes classiques de diagnostic du paludisme en raison du temps de réalisation relativement long, de ses exigences en matériels et personnel qualifié et de son coût.

### **II.2.7 Traitement et prévention du paludisme**

#### **II.2.7.1 Traitement du paludisme**

La prise en charge efficace des cas de paludisme est un élément fondamental de la lutte antipaludique en Afrique subsaharienne où, la plupart des infections paludéennes sont dues à *P. falciparum* et donc sont potentiellement mortelles (Greenwood *et al.* , 2005). Le traitement du paludisme fait appel à différents antipaludiques qui possèdent des mécanismes d'action différents. L'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement du paludisme est très réduit à cause de la chimiorésistance. Par conséquent, le choix du traitement est basé sur la fréquence des cas de résistances dans la zone considérée, et sur l'importance d'éventuels effets indésirables provoqués par certains antipaludiques. Les antipaludiques sont classés soit en fonction de leur origine naturelle (Tableau 1) ou de synthèse. Ils peuvent également être classés selon leur action sur diverses formes évolutives du parasite chez l'homme. Parmi eux, on distingue les schizonticides, actifs sur les stades asexués intra-érythrocytaires et les gamétocytocides, actifs aussi bien sur les gamétocytes sanguins que sur les stades intra-hépatiques (hypnozoïtes). Enfin, ils peuvent être classés suivant leur mode d'action rapide (quinines et amino-4-quinoléines) pour lesquels l'apparition de la chimiorésistance est

longue; et les antipaludiques d'action lente (antifoliques et antifoliniques) dont l'usage génère beaucoup plus vite la chimiorésistance rendant inefficaces certains traitements (Oliver *et al.*, 2008; Pradines *et al.*, 2003).

**Tableau 1 : Les différents médicaments antipaludiques**

Origines	Dérivés	Molécules	Action	Sites d'action
Antipaludiques Naturels	Alcaloïdes	Quinine, quinidine, cinchonine,	Schizonticides	Vacuole digestive
	Quinghaosu	Artémisinine, Artémether, Artésunate	Schizonticides	Vacuole digestive
Antipaludiques de synthèse	Amino-4-Quinoléines	Chloroquine, Amodiaquine,	Schizonticides	Vacuole digestive
	Aryl-Amino-Alcools	Méfloquine, Halofantrine	Schizonticides	Vacuole digestive
	Antifoliques et Antifoliniques	Sulfadoxine, Pyriméthamine	Schizonticides	Cytoplasme
	Naphtoquinones	Atovaquone	Schizonticides	Mitochondrie
	Antibiotiques	Cyclines, Macrolides,	Schizonticides	Ribosome
	Amino-8-quinoléines	Primaquine, Tafénoquines, Quinocides, Bulaquines, Pamaquines, Plasmocides	Gamétocytocides	Mitochondrie

En réponse à l'augmentation croissante de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques, l'OMS a recommandé aux pays d'endémie palustre l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* (WHO, 2006). L'antipaludique à associer aux dérivés de l'artémisinine doit avoir une efficacité thérapeutique en monothérapie supérieure à 80% dans la zone cible. Les options thérapeutiques actuellement recommandées par l'OMS sont les suivantes : artémether-luméfantrine ; artésunate-amodiaquine ; artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine ; artésunate plus méfloquine (AS + MQ) ; dihydroartémisinine-pipéraquine. Au Burkina Faso, AL et AS-AQ ont été adoptés depuis février 2005 comme traitements de première ligne du paludisme simple (MS, 2005).

### II.2.7.2 Prévention du paludisme

Les stratégies de prévention du paludisme incluent la prophylaxie par la prise de médicaments, l'éradication des moustiques et la prévention des piqûres de moustiques. En raison de l'échec des différents programmes d'éradication du paludisme et des difficultés de mise en œuvre des mesures collectives de prévention, la prévention du paludisme à l'échelle

individuelle semble beaucoup plus envisageable. En zone émie palustre, la prévention individuelle s'adresse prioritairement aux couches vulnérables (enfants <5 ans, femmes enceintes et les personnes âgées) et aux sujets non-immuns se rendant en zone impaludée. Une prévention efficace doit associer une protection contre les piqûres de moustiques et une chimioprophylaxie médicamenteuse adaptée en fonction du contexte épidémiologique de la zone en question. La prescription d'une chimioprophylaxie relève d'une consultation spécialisée et personnalisée. Il est par ailleurs important de signaler que même l'observation scrupuleuse de ces mesures préventives n'assure pas une protection à 100% contre le paludisme. Elle constitue un traitement préventif des accès cliniques et ne met pas à l'abri d'un accès de reviviscence tardif à *P. vivax* ou *P. ovale*.

En zone d'endémie palustre d'Afrique subsaharienne, la SP est recommandée pour le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes (World Health Organization., 2008), des nourrissons (Armstrong Schellenberg *et al.*, 2010) et des enfants (Sesay *et al.*, 2010) au détriment de la CQ. Plus récemment, l'OMS a recommandé l'utilisation de l'AQ-SP pour la chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 0 à 59 mois vivant en zone de forte transmission saisonnière (WHO, 2011).

## **II.2.8 Immunité antipaludique**

L'acquisition de l'immunité contre *P. falciparum* en zone d'endémie palustre résulte d'une exposition répétée au parasite et augmente avec l'âge des sujets (Doolan *et al.*, 2009). Elle baisse au contraire avec l'âge lorsque l'exposition diminue (O'Meara *et al.*, 2008). Une exposition répétée favorise l'atténuation de l'impact clinique de la maladie. Dans les zones où la transmission du paludisme est intense et pérenne, il s'établit progressivement chez l'hôte un état de tolérance à la présence du parasite se traduisant par une faible parasitémie (immunité antiparasitaire) d'une part et l'absence de symptômes (immunité clinique) d'autre part. Cet état est appelé «état d'immunité relative ou de prémuniton». De nombreuses études ont également montré que le paludisme au cours des premiers mois de vie est un phénomène rare. Elle s'explique par la transmission transplacentaire d'anticorps antipalustres maternels d'une part (Duffy, 2007; Riley *et al.*, 2001) et la présence de l'hémoglobine fœtale (HbF) qui inhibent le développement du parasite dans les hématies. Les nouveau-nés seraient également protégés par des facteurs tels que la lactoferrine et les IgA sécrétoires (Gwamaka *et al.*, 2012; Kassim *et al.*, 2000). Les mécanismes effecteurs de la réponse immune chez l'homme sont peu connus en raison de la difficulté à définir des critères épidémiologiques, cliniques ou



parasitologiques simples susceptibles de caractériser cet état de prémunition et de définir clairement quels sont les individus « protégés » (Baird et Snow, 2007).

Outre les facteurs immunologiques de résistance au paludisme, des facteurs génétiques peuvent conférer une protection contre le paludisme grave. Au nombre de ces facteurs, on peut citer :

- La drépanocytose (du grec *drepanos*, «faucille» au regard de la forme allongée qu'ont un certain nombre d'hématies) aussi appelée hémoglobinose «S», sicklémie ou anémie falciforme : une modification dans la chaîne «β» de l'hémoglobine entraîne une déformation des globules rouges, ce qui produit des hétérozygotes qui protègent mieux contre le paludisme. Les hématies sont déformées, l'hémoglobine cristallise, empêchant ainsi l'entrée du parasite dans l'hématie. Ce changement entraîne cependant une mauvaise oxygénation des organes et donc, de sévères complications, allant jusqu'au décès pour les sujets homozygotes (HbS/HbS). La prévalence de la drépanocytose (HbA/HbS) est élevée dans les populations africaines soumises à une forte pression du paludisme en raison de la résistance qu'elle procure contre les accès graves de la maladie (Ohashi *et al.*, 2004; Verra *et al.*, 2007).
- le groupe sanguin «O» qui protège contre les formes sévères par l'inhibition de la formation de rosettes (Pathirana *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 2007) ;
- les thalassémies (Mockenhaupt *et al.*, 2004); le sujet est porteur du gène SS entraînant une modification des taux de synthèse des chaînes de globines avec pour conséquence une mauvaise circulation du sang et une fatigue constante ;
- le déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) ou favisme, une enzyme antioxydante protégeant contre les effets du stress oxydatif dans les globules rouges, donne une protection accrue contre le paludisme grave (Guindo *et al.*, 2007) ;
- l'absence de l'antigène *Duffy* sur les érythrocytes de certains sujets peut conférer une protection contre l'infection par *P. vivax* ou par *P. knowlesi*. Cela constitue un exemple davantage sélectif de la population Ouest-Africaine, où ce groupe sanguin est très fréquent. Cependant, cette situation pourrait être revue, *P. vivax* ayant réussi à s'adapter à Madagascar suite au brassage génétique entre population africaine et asiatique (Rayner, 2009) et plus récemment au Mali (Bernabeu *et al.*, 2012) ;
- le groupe « Antigène de Leucocyte Humain » (en anglais HLA pour Human Leucocyte Antigen) est associé à un faible risque de paludisme grave. Cette molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de «classe I» présente dans le foie

est un antigène des lymphocytes «T» contre le stade sporozoïte. Cet antigène, encodé par l'Interleukin-4 (IL4), produit par les cellules «T» favorise la prolifération et la différenciation de la production d'anticorps-cellules «B». Une étude des Peuls du Burkina Faso, ayant moins de deux épisodes de paludisme avec des niveaux plus élevés d'anticorps antipaludiques que les groupes ethniques voisins, a montré que l'allèle IL4-524T était associé à des niveaux élevés d'anticorps contre le paludisme, suggérant la possibilité que cet allèle pourrait être un facteur d'augmentation de la résistance au paludisme (Zhang *et al.*, 2009).

## **II.2.9 Résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques**

### **II.2.9.1 Définition de la résistance**

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques constitue un obstacle majeur dans la lutte contre le paludisme. En dépit de la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques et de l'adoption effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement du paludisme, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les CTA (Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2008). L'organisation mondiale de la santé (OMS) a défini en 1967 la résistance comme étant la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du malade (WHO Scientific Group on Chemotherapy of Malaria. et World Health Organization., 1967). Il a été ajouté à cette définition en 1986 que la forme active du médicament devait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale (Bruce-Chwatt *et al.*, 1986). Il s'agissait de tenir compte du fait que les individus pouvaient différer par leur capacité à métaboliser les antipaludiques comme les sulfonamides et les sulfones, que les molécules antipaludiques pouvaient se lier fortement aux protéines plasmatiques et que des médicaments administrés de façon simultanée pouvaient avoir un effet antagoniste sur l'efficacité de l'antipaludique (ex. l'acide folique peut altérer l'effet de la sulfadoxine-pyriméthamine). La résistance aux antipaludiques est encore plus compliquée par le phénomène de la résistance croisée qui se produit entre les médicaments appartenant à la même famille chimique ou ayant le même mode d'action.

### II.2.9.2 Emergence et propagation de la résistance

Le développement de la résistance peut s'expliquer d'abord par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et ensuite par les masses très importantes de parasites portées par les individus infectés. En effet, les mutations conférant la résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables mais les fortes densités parasitaires favorisent l'apparition et la sélection des mutations sous l'effet de la pression médicamenteuse. Aussi, les erreurs de réplication de l'ADN dans les cellules introduisent des mutations au hasard dans le génome, permettant ainsi le processus d'évolution. Les mutations sont à l'origine de la grande variabilité génétique de *P. falciparum* et lorsque celles-ci ne sont ni létales pour le parasite, ni silencieuses, elles peuvent dans certains cas avantager sa survie en lui permettant par exemple d'échapper au système immunitaire de son hôte, de supporter la présence de molécules toxiques dans son environnement ou de se multiplier plus rapidement que d'autres clones. Certains parasites mutants qui survivent en présence d'un antipaludique deviennent ainsi résistants et transmettent par la suite la mutation à leurs descendants, générant ainsi une population capable de résister à une molécule (World Health Organization., 2010a). Les événements génétiques sont caractérisés par les mutations ou les changements du nombre de copies des gènes qui déterminent la cible du médicament ou qui affectent la pompe régulant la concentration intra-parasitaire du médicament. Un seul événement génétique pourrait être suffisant mais dans certaines situations plusieurs événements génétiques sont nécessaires (Valderramos *et al.*, 2010). La fréquence des mutations et la vitesse à laquelle les résistances se développent dépendent des caractéristiques de la molécule utilisée, du contexte épidémiologique et de la façon dont les médicaments sont utilisés.

L'exposition des parasites à des concentrations de médicaments inférieures au seuil thérapeutique favorise davantage la sélection des parasites mutants résistants aux médicaments (White et Pongtavornpinyo, 2003). En effet, une concentration inadéquate de médicament élimine seulement les parasites sensibles. La prévention de la propagation de la résistance devient difficile une fois que les parasites résistants émergent et sont sélectionnés au détriment des parasites sensibles. Toutefois le phénotype de résistance acquis après mutation n'est pas toujours un avantage en l'absence de pression médicamenteuse (Felger et Beck, 2008). Aussi, la propagation des nouvelles résistances émergentes dépend de la recrudescence et de la transmission subséquente d'une infection ayant généré un nouveau parasite résistant (World Health Organization., 2010a). La production de gamétocytes à partir

de l'infection recruescente devrait être prévenue par l'administration précoce du traitement approprié. IL existe une fenêtre de temps durant lequel le niveau du médicament avantage la survie du parasite résistant par rapport au parasite sensible (Stepniewska et White, 2008). La propagation subséquente des parasites mutants est facilitée par l'administration des médicaments à longue durée d'action. L'activité antipaludique résiduelle présent après traitement sert de « filtre sélectif », prévenant seulement l'infection des parasites sensibles. Ainsi, Les médicaments tels que la chloroquine, la méfloquine et la pipéraqune qui persistent longtemps dans le sang après leur administration représentent des filtres sélectifs (Yeung *et al.*, 2004).

Le niveau de transmission du paludisme dans une zone influence également la propagation de la résistance du parasite aux antipaludiques (Hastings et Mackinnon, 1998). Des études épidémiologiques ont montré que les zones de faible transmission sont les premières origines de la résistance (Roper *et al.*, 2004). En effet, dans les zones à faible transmission, la plupart des infections sont symptomatiques et de ce fait, plusieurs personnes reçoivent des traitements antipaludiques favorisant ainsi les opportunités de sélection de mutants. Les zones à forte transmission sont moins susceptibles à l'émergence de la résistance principalement parce-que la plupart des infections sont asymptomatiques et les infections se répètent le long de la vie. Dans ces zones, il s'établit progressivement chez l'hôte une immunité partielle se traduisant par une faible parasitémie ou par l'absence de symptômes. L'immunité peut également jouer un rôle considérable dans le ralentissement de l'émergence et de la propagation de la résistance. Le système de défense de l'hôte possède un effet antiparasitaire majeur. Tout parasite résistant généré entre en compétition non seulement avec l'antipaludique mais aussi avec le système immunitaire de l'hôte qui tue les parasites sans tenir compte de leur phénotype de résistance réduisant ainsi leur probabilité de survie à tous les stades de leur cycle de transmission.

Les autres facteurs favorisant l'émergence de résistances sont (White, 1999) :

- une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés conduisant à des traitements incomplets,
- une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies
- la consommation de contrefaçons sous dosées qui est un facteur permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister.

### II.2.9.3 Surveillance de l'efficacité et de la résistance des antipaludiques

L'OMS a fait des efforts considérables pour standardiser les méthodes d'évaluation d'efficacité de médicaments antipaludiques pendant les 40 dernières années, mais les recommandations les concernant ont changé plusieurs fois, en fonction de l'avis des experts de chaque époque et de l'avancée des connaissances. La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est donc le test *in vivo* de l'OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2001 (WHO, 2005). La confirmation de la résistance exige la preuve :

- que les parasites sont recrudescents chez un patient qui a récemment reçu le traitement à dose adaptée et
- que la concentration sanguine efficace du médicament ou de ses métabolites actifs a été maintenue pour au moins quatre cycles parasitaires (WHO, 2005).

En effet, des résistances apparentes peuvent en fait être dues à des différences interindividuelles de pharmacocinétique des antipaludiques testés. C'est le cas par exemple de l'atovaquone, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine. Les tests *in vivo* consistent à administrer une dose standard d'antipaludique à des malades infectés par *Plasmodium* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie. Les principales limitations des tests *in vivo* sont liées à leur dépendance :

- à l'observance thérapeutique, la posologie et la qualité des médicaments qui doivent normalement être strictement contrôlées au cours des essais,
- aux variations interindividuelles de pharmacocinétique (absorption, élimination, biotransformation-métabolisme du médicament absorbe etc.),
- à l'immunité naturellement acquise des individus qui biaise les résultats
- à l'état nutritionnel du patient et
- à la sensibilité et la spécificité du diagnostic parasitologique des rechutes ou de l'absence de clairance parasitaire ainsi que de la distinction entre véritable rechute et nouvelle infection.

Les tests *in vivo* impliquent le suivi prolongé d'individus ( $\geq 28$  jours) et donc une logistique importante et des ressources humaines qualifiées pour ce type d'étude clinique. Ils ne permettent de tester qu'un seul médicament par individu et qu'un petit nombre de médicaments par étude. Les tests *in vitro* permettent par contre d'étudier simultanément la sensibilité de *P. falciparum* à plusieurs antipaludiques en faisant abstraction des facteurs liés au patient. Ils sont cependant chers et complexes à mettre en œuvre, ils nécessitent des

infrastructures importantes, des personnels très qualifiés et spécialisés et l'utilisation de parasites vivants. Cela implique des délais brefs de réalisation après le prélèvement des souches et le respect de règles strictes de biosécurité. Par ailleurs, leurs résultats n'ont pas toujours été corrélés aux résultats des tests *in vivo* et ne sont pas toujours reproductibles d'une équipe à l'autre en raison de différences entre les techniques et les protocoles utilisés. Pour ces raisons, les tests *in vitro* sont utilisés pour la surveillance de la chimiosensibilité mais n'ont pas d'utilité en clinique. Il existe enfin des tests « moléculaires ». Il s'agit des méthodes de génotypage réalisées sur l'ADN du parasite. Ces méthodes ont profité de l'essor de la biologie moléculaire et de la connaissance récente du génome de *P. falciparum*. Il s'agit de chercher les modifications des gènes du parasite impliqués dans sa résistance aux antipaludiques. Ces différents marqueurs moléculaires de résistance sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 2 : Les marqueurs de résistance associés aux différents antipaludiques**

Médicaments	Marqueurs de résistance		Niveau de validation
	Gènes	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	<i>Pfcr1</i>	Lys 76 Thr	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Amodiaquine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86Tyr	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Méfloquine	<i>Pfmdr1</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vivo</i>
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhps</i>	Ala437Gly + Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr+pfhps</i>	Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg + Ala437Gly+ Lys540Glu	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfmrp</i>	Lys1466Arg	Association <i>in vivo</i>
Proguanile	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Thr + Ala16Val	Association <i>in vivo</i>
	<i>Pfdhfr</i>	Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	Association <i>in vivo</i>
Atovaquone	<i>Pfcytb</i>	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	Association <i>in vivo</i>
Luméfantine	<i>Pfmdr1</i>	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	<i>Pfnhe-1</i>	Nombre de motifs : DNNND >2 ou NHNDNHNNDDDD <3	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmrp</i>	His191Tyr et Ser437Ala	Association <i>in vitro</i>
Doxycycline	<i>pftetQ</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association <i>in vitro</i>
	<i>pftetQ</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
	<i>Pfmdt</i>	Nombre de copie > 1	Association <i>in vitro</i>
Arthéméter	<i>Pfserca</i>	Ser769Asn	Association <i>in vitro</i>
Artémisinine	<i>K13 propeller</i>	M476I, C580Y, R539T, Y493H	Association <i>in vitro</i> Association <i>in vitro</i>

### **III MATERIELS ET METHODES**

#### **III.1 SITES D'ETUDE**

Le matériel biologique de cette étude proviennent de trois études cliniques qui ont été conduites par une équipe de recherche sur le paludisme de l'IRSS-DRO respectivement dans les districts sanitaires de Dô (CSPS de Colsama, Sarfalao), du secteur 15 (Centre de Santé et de promotion sociale (CSPS) de Ouezzin-ville) et de LENA (CSPS de Satiri, Balla et Kadomba). Les échantillons ont été acheminés dans les laboratoires de l'IRSS-DRO et de la division des maladies infectieuses de « University of California, San Francisco (UCSF) ».

##### **III.1.1 Le district sanitaire de Dô**

Le district sanitaire de Dô est l'un des huit districts de la Région des Hauts Bassins. Avec une superficie de 3208,5 km<sup>2</sup> il couvre la commune urbaine de Bobo-Dioulasso et les communes rurales de Péni, de Karangasso/Sambla et de Toussiana. Le district sanitaire de Dô comprend vingt huit (28) formations sanitaires publiques dont un (01) Centre Médical avec Antenne chirurgicale (CMA) et vingt sept (27) CSPS. Les formations sanitaires privées sont au nombre de quatre vingt neuf (89) dont une infirmerie de Garnison, 07 infirmeries des écoles, 9 formations sanitaires privées confessionnelles, 18 infirmeries de l'office de santé des travailleurs, 27 formations sanitaires privées et 27 officines. La population du district était de 504895 habitants en 2013 (Recensement général de la Population 2006 réactualisée). Sa densité moyenne est estimée à environ 157,36 habitants au kilomètre carré. Le paludisme avec 38,83% de prévalence, demeure la première cause de consultation au niveau des formations sanitaires. Les participants des deux premières études ont été recrutés dans trois formations sanitaires que sont les CSPS de Colsama, Sarfalao et Ouezzin-Ville.

##### **III.1.2 Le district sanitaire de LENA**

Le district sanitaire de LENA créé en 2007 est situé à l'ouest de la ville de Bobo-Dioulasso, région des Hauts-Bassins. Avec une superficie de 1756,5 Km<sup>2</sup>, il se décompose en 13 formations sanitaires issues de 30 villages et 44 hameaux de culture. Les participants de l'étude « Efficacité et tolérance de la Dihydroartémisinine-Pipéraquline pour le traitement intermittent saisonnier préventif du paludisme chez les enfants de 3-59 mois à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso » ont été recrutés dans trois formations sanitaires du district de Léna que sont les CSPS de Satiri, Balla et Kadomba.



### **III.1.3 L'Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale de l'Ouest (IRSS-DRO)**

Créé en 1997, l'institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), un des quatre instituts que compte le Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CNRST) s'est donné pour mission de contribuer au développement de la santé du Burkina Faso par la Recherche-Développement. L'IRSS-DRO, la seule direction régionale de l'IRSS a vu le jour en 1999 à Bobo-Dioulasso sous la direction du Professeur Jean-Bosco OUEDRAOGO. Les thématiques de recherche de cette institution sont essentiellement le paludisme (parasitologie et entomologie), la nutrition, la microbiologie (bactériologie et virologie), la pharmacologie et pharmacognosie.

### **III.1.4 La division des maladies infectieuses de l'Université de Californie, San Francisco (UCSF)**

La division des maladies infectieuses à l'université de Californie (USA) est une division académique dans le département de Médecine focalisée aussi bien sur la recherche tout comme la clinique. Cette division offre un programme rigoureux de bourses en sciences basique et en recherche clinique afin de produire des scientifiques et chercheurs de calibre exceptionnel. C'est dans ce cadre que nous avons eu l'opportunité de séjourner à plusieurs reprises dans le laboratoire du Professeur Phillip John ROSENTHAL où nous avons effectué une partie de nos travaux de laboratoire.

## **III.2 SOURCES ET PERIODES DE COLLECTE DU MATERIEL BIOLOGIQUE**

Le matériel biologique du présent travail a été fourni par trois études cliniques conduites dans des CSPS de la région de Bobo-Dioulasso :

- Un premier essai clinique, randomisé comparant l'efficacité thérapeutique de l'AQ-SP, l'AL et la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple au Burkina Faso. Cet essai a été conduit entre juillet et décembre 2006 dans les CSPS de Colsama, Ouezzin-ville et Sarfalao.
- Un second essai clinique non randomisé évaluant la pharmacocinétique et l'efficacité de la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple au Burkina Faso. Il a été également conduit dans les CSPS de Colsama, Ouezzin-Ville et Sarfalao entre juillet et Décembre 2007.
- Un troisième essai clinique randomisé ouvert comparant l'efficacité et la tolérance de la DHA-PQ et de la SP-AQ dans le traitement préventif intermittent du paludisme des

enfants de 3-59 mois à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Cet essai a été conduit entre août et décembre 2009 dans les CSPS de Satiri, Balla et Kadomba.

### **III.3 POPULATION D'ETUDE**

#### **III.3.1 Estimation de la taille de l'échantillon des différentes études.**

Pour le premier essai clinique randomisé comparant l'efficacité thérapeutique de l'AQ-SP, l'AL et la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple au Burkina Faso, nous avons estimé que le risque de récurrence parasitaire après 42 jours de suivi serait différent dans chaque bras de traitement. Sur la base des études antérieures ayant estimé les récurrences parasitaires à 15% et 5% respectivement après traitement à AL et AQ-SP, nous avons estimé après qu'un total de 176 patients (avec des perdus de vue estimés à 10%) serait suffisant dans chaque bras de traitement pour détecter une différence de 10% dans le taux de récurrence parasitaire avec une puissance de 80% et un seuil de risque à 5%.

Dans la deuxième étude évaluant la pharmacocinétique et l'efficacité de la DHA-PQ nous avons évalué l'association entre la faible concentration en pipéraquline et les réponses au traitement. Les ressources disponibles nous avaient permis de suivre 300 patients jusqu'à la fin de l'étude. Avec une estimation de 10% de perdus de vue au cours des 42 jours de suivi nous avons inclus 330 patients dont 200 d'entre eux âgés entre 2 et 10 ans ont participé à l'étude de la pharmacocinétique.

La taille totale de l'échantillon de notre troisième essai clinique, a été calculée en se référant à l'incidence des épisodes palustres (4%) chez les enfants du même groupe d'âge rapporté par Sokhna et collaborateurs en 2008. Pour déterminer si la DHA-PQ était aussi efficace que l'association l'AQ-SP avec une marge de 4% avec 10% de perdus de vue, 1500 enfants ont été randomisés pour une puissance de 90% et 95% d'intervalle de confiance (seuil de 2,5%). La marge de 4% a été retenue en estimant que l'incidence du paludisme chez les enfants n'ayant pas reçu le TPI sera de 40% et celle chez les enfants sous TPI, moins de 5% avec 4% la plus grande marge jugée non importante.

#### **III.3.2 Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion des deux premiers essais étaient identiques : les patients ayant été diagnostiqués positifs à la goutte épaisse ont été évalués pour l'inclusion dans les essais suivant les critères ci-dessous :

- N'avoir pas encore participé à cette étude en cours

- Etre âgé de plus de 6 mois
- Avoir un poids  $\geq 5$  kg
- Fièvre ( $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$  axillaire) ou histoire fébrile les dernières 24 h
- Absence d'effet secondaire grave au médicament à l'étude
- Absence de maladies concomitantes associées avec le paludisme
- Provision d'un consentement éclairé et habilité à respecter le suivi
- Pas de prise d'autres antipaludiques dans les 2 dernières semaines
- Absence de signes de danger ou de paludisme grave.

Les critères d'inclusion du troisième essai clinique étaient sensiblement identiques à ceux des deux essais précédents à quelques exceptions près :

- Etre âgé entre 3 et 59 mois
- Accepter de visiter la formation sanitaire en cas de fièvre ou autres maladies et éviter de prendre des médicaments en dehors de l'étude
- Accepter les visites à domicile (par le personnel de l'étude)

### **III.3.3 Critères de non inclusion**

- Allergie connue aux médicaments de l'étude : SP, AQ, DHA-PQ
- Présence d'une condition ou affection médicale nécessitant une hospitalisation au moment du screening.
- Intention de quitter la zone d'étude pendant le suivi
- Affection médicale chronique
- Infection VIH connue

## **III.4 COLLECTE DES DONNEES**

### **III.4.1 Les prélèvements sanguins**

Pour chaque participant des deux premiers essais cliniques des prélèvements sanguins ont été effectués au bout du doigt pour la confection de goutte épaisse (GE) / Frottis Sanguin (FS) au jour 0 à l'inclusion et aux jours 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35 et 42 après le début du traitement. Quelques gouttes de sang ont également été recueillies aux mêmes périodes sur du papier filtre pour les analyses génétiques de *P. falciparum*. Pour Les participants âgés de 2 à 10 ans dans le deuxième essai clinique, les prélèvements sanguins du jour 7 comprenaient environ 200ul de sang capillaire et 2-5ml de sang veineux conservé dans un tube EDTA. Pour le troisième essai clinique, des confettis et GE/FS ont été réalisés chez tous les participants à

chaque round de traitement préventif, à l'enquête finale ainsi qu'à chaque visite imprévue du participant au site d'étude.

#### III.4.2 Examens microscopiques des parasites

Pour l'examen microscopique des parasites, nous avons effectué une goutte épaisse et un frottis sanguin. Le frottis a été fixé au méthanol. Les lames ont été ensuite colorées au Giemsa 10% pendant 10 minutes, puis séchées et lues à l'objectif 100X du microscope sous huile à immersion. Les densités parasitaires (DP), exprimées en nombre de parasites par microlitre ( $\mu\text{L}$ ) de sang ont été calculées à partir de la lecture des gouttes épaisses selon la méthode suivante : le nombre de parasites par microlitre de sang est établi par rapport au nombre de leucocytes fixé à 8.000/ par microlitre de sang. La densité parasitaire (DP) est donc obtenue suivant la formule :

$\text{DP} = (\ll n \gg * 8.000) / \mathbf{X}$ .  $n$  = nombre de parasites comptés et  $\mathbf{X}$  = nombre de leucocytes comptés. Si le nombre de parasites «  $n$  » est  $\geq 10$  on compte au moins  $\mathbf{X} = 200$  leucocytes.

$\text{DP} = n * 8.000 / 200 = n * 40$ . Si le nombre de parasites «  $n$  » est  $< 10$ , on compte au moins  $\mathbf{X} = 500$  leucocytes et la densité parasitaire sera :

$$\text{DP} = n * 8.000 / 500 = n * 16$$

Le FS a servi principalement à l'identification des espèces de *Plasmodium*.

#### III.4.3 Mesure de la concentration en PQ

Les échantillons de sang veineux et capillaires prélevés ont été ensuite centrifugés à 2000g pendant 10 minutes et le plasma séparé a été conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'envoi au Département de pharmacologie clinique de la faculté de Médecine Tropicale, de l'Université de Mahidol, Bangkok en Thaïlande. La concentration plasmatique en PQ a été déterminée par une méthode validée de spectrophotométrie de masse de chromatographie liquide (Lindegardh *et al.*, 2008).

Pour le contrôle de qualité, des standards de 4,5, 20 et 400 ng/ml ont été analysés avec chaque lot pour assurer la précision de chaque essai. La déviation standard des échantillons de contrôle de qualité était en dessous de 5%, indiquant ainsi une excellente performance de l'essai. La limite inférieure de quantification était fixée à 1.50 ng/ml.

### III.4.4 Techniques de génotypage de *P. falciparum*

#### III.4.4.1 Extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN du parasite a été extrait des confettis à partir de la méthode de chelex (Plowe et Wellems, 1995). Les érythrocytes ont été lysés dans une solution contenant 1ml de « phosphate Buffered Saline » (PBS) 1X, 50µL de saponine 10% puis l'ADN fut séparé des autres composants cellulaires dans 100µL d'eau et 50µL de chelex dilué à 20%.

#### III.4.4.2 Amplification des extraits d'ADN par la «polymerase chain reaction» (PCR)

Pour les échantillons des échecs thérapeutiques des deux premiers essais, nous avons d'abord amplifié les régions polymorphiques répétitives du bloc 2 de *msp-1*, du bloc 3 de *msp-2* par une PCR nichée « nested PCR » pour étudier le polymorphisme de *P. falciparum* (Viriyakosol *et al.*, 1995) afin de distinguer les recrudescences des nouvelles infections. Nous avons par la suite procédé au génotypage de quatre microsatellites (TA40, TA60, Pfk2, TA81) pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus. Des échantillons ont été également sélectionnés au hasard dans chacun des trois essais pour évaluer par la PCR nichée les polymorphismes génétiques de *pfmdr1* (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y), *pfprt* (K76T), *pfdhr* (N51I, C59R, S108N, I164L) et *pfdhps* (S436A, A437G, K540E).

La technique de la PCR nichée consistait à utiliser au cours de la première amplification un premier couple d'amorces pour amplifier le segment du gène comprenant la région de polymorphisme puis à la deuxième amplification un second couple d'amorces spécifiques aux différentes familles alléliques (K1, MAD 20 et RO33 pour *msp1* et FC27 et 3D7 pour *msp2*) ou aux points de mutations étudiés des gènes *pfmdr1*, *pfprt*, *pfdhr* et *pfdhps*. Les mélanges de la réaction ont été préparés sous une hotte avec du matériel stérilisé conformément à la composition décrite dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Composition des mélanges de la réaction PCR**

Réactifs	PCR 1		PCR 2	
	Concentrations	Volumes ( $\mu\text{L}$ ) à prélever	Concentrations	Volumes ( $\mu\text{L}$ ) à prélever
<b>H<sub>2</sub>O ultra pure</b>		15,3		<b>15,3</b>
<b>Amorce sens</b>	10 $\mu\text{M}$	0,5	10 $\mu\text{M}$	<b>0,5</b>
<b>Amorce antisens</b>	10 $\mu\text{M}$	0,5	10 $\mu\text{M}$	<b>0,5</b>
<b>Buffer</b>	10X	2,5	10X	<b>2,5</b>
<b>dNTPs</b>	2 mM	2,5	2 mM	<b>2,5</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,5	25 mM	<b>1,5</b>
<b>Taq polymérase</b>	5 U/ $\mu\text{L}$	0,2	5 U/ $\mu\text{L}$	<b>0,2</b>
<b>Extrait d'ADN</b>	Inconnue	2	inconnue	<b>2</b>
<b>Volume final =</b>		<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>		

Après avoir nettoyé les mains à l'aide d'un antiseptique, nous désinfectons la surface de manipulation à l'aide d'alcool 70°. Cela avait pour but de limiter les contaminations qui pourraient être liées aux manipulations antérieures. Des microtubes de 0,2 ml (ou des plaques PCR) étaient alors numérotés selon le nombre d'échantillons à amplifier. Les volumes individuels des réactifs et solvants qui entraient dans la composition du mélange étaient alors calculés et multipliés au nombre total d'échantillons à amplifier plus un témoin positif et un témoin négatif. Pour chaque mélange préparé, on ajoutait un extra de 10% du nombre d'échantillons en prévision des erreurs de pipetage. Les volumes requis étaient successivement ajoutés dans l'ordre : eau distillée, amorces, buffer, dNTP, Mgcl<sub>2</sub>, Taq polymérase en utilisant pour chaque réactif un cône différent. Un volume de 23 $\mu\text{L}$  de mix était ensuite distribué dans chaque puits de PCR. À ces 23 $\mu\text{L}$ , on ajoute 2 $\mu\text{L}$  d'ADN et on incubait les tubes (ou la plaque) dans un thermocycler (S1000 et C1000, Biorad) pour l'amplification suivant un programme spécifique.

La seconde réaction consistait à ajouter 2  $\mu\text{L}$  de la première amplification dans un mélange préparé dans les mêmes conditions que celles de la première. Pour cette seconde réaction, seul le changement des amorces marquait la différence avec la première réaction. Les programmes d'amplification préalablement enregistrés dans le thermocycler se résument généralement en trois grandes étapes :

- L'étape de dénaturation : Elle se déroulait entre 94-95°C et durait environ 5 minutes pour le premier cycle. Il s'agissait de dénaturer l'ADN double brin en mono brins.
- L'étape d'hybridation des amorces ou "annealing" : La température d'hybridation variait selon les amorces utilisées. La durée était d'environ 1 minute 30 secondes,

juste le temps aux amorces de s'hybrider correctement, l'ADN total plus long n'aura pas le temps de se réhybrider.

- L'étape d'élongation : La température d'élongation généralement 72°C correspondait à la température optimale de la Taq polymérase.

Dans cette étude, nous avons choisi de génotyper 4 des douze microsatellites validés pour le génotypage des échantillons de sang sur papier filtre (confettis). Les amorces ont été synthétisées pour une PCR simple. Les amorces «Sens» étaient marquées à l'extrémité 5' avec un fluorophore HEX ou 6-FAM tandis-qu'une «queue» 5' GTGTCTT a été ajoutée aux amorces «antisens» pour promouvoir l'addition en extra de base d'adénosine afin d'uniformiser la taille des produits PCR. Les conditions de la réaction ont été optimisées de sorte à favoriser la détection des allèles rares. Les tableaux 4 et 5 ci-dessous récapitulent les séquences des amorces et les programmes d'amplification des différents gènes.

**Tableau 4 : Séquences d'amorces et programmes d'amplification des gènes MSP1 et MSP2**

Gènes		Amorces et séquences (5'-3')	Programmes d'amplification
<i>MSP1</i>	PCR 1.	O1 :5'- CACATGAAAGTTATCAAGAACTTGTC-3' O2 :5'-GTACGTCTAATTCATTTGCACG 3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x 30; 72°Cx 3min
	PCR 2 .	N1 : 5'-GCAGTATTGACAGGTTATGG-3' N2 : 5'-GATTGAAAGGTATTTGAC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 35s; 68°C x 2min 30s) x30; 72°Cx 3min
<i>MSP2</i>	PCR 1.	S3: 5'-GAAGGTAATTAACATTGTC-3' S2: 5'-GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 42°C x 1min; 65°C x 2min,) x30; 72°C x 3min
	PCR 2.	S1: 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3' S4: 5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	94°C x 3min; (94°C x 25s; 50°C x 1min; 70°C x 2min,) x30; 72°C x 3min

**Tableau 5 : Séquences d'amorces et programmes d'amplification de *pfmdr1*, *pfprt* et microsatellites**

Gènes étapes de la PCR	Amorces (5..... 3')	Programme d'amplification
<i>Pfmdr1</i> 86 et 184 PCR 1	MDR-A1 : TGT TGAA AGA TGG GTA AAG AGC AGA AAG AG MDR-A3: TAC TTT CTT ATT ACA TAT GAC ACC ACA AAC A	94°C x 2min, 30x (94°C x 1min, 45°C x 1min, 72°C x 45s), 72°C x 5 min, <u>Garder</u> à 4 °C
<i>Pfmdr1</i> 86 et 184 PCR 2	MDR-A4 : AAA GAT GGT AAC CTC AGT ATC AAA GAA GAG MDR-A2: GTC AAA CGT GCA T TT TTT ATT AAT GAC CAT TTA	94°C x 2min, 30x (94°C x 1min, 52°C x 1min, 72°C x 45s), 72°C x 5 min, <u>Garder</u> à 4°C
<i>Pfmdr1</i> - 1034, 1042, 1246 PCR 1	MDR-O1 : AGA AGA TAT TTC TGT AAT TTG ATA CAA AAA GC MDR-O2: ATG ATT CGA TAA ATT CAT CTA TAG CAG CAA	94°C x 2min 30 x (94°C x 1min, 52°C x 1min, 72°C x 45s) , 72°C x 5 min, <u>Garder</u> à 4°C
<i>Pfmdr1</i> 1034&1042 PCR 2	1034F : AGA ATT ATT GTA AAT GCA GCT TTA TGG GGA CTC 1042R : AAT GGA TAA TAT TTC TCA AAT GAT AAC TTA GCA	94°C x 2min 30 x (94°C x 1min, 52°C x 1min, 72°C x 45s), 72°C x 5 min, <u>Garder</u> à 4°C
<i>Pfmdr1</i> 1246 PCR 2	1246F: ATG ATC ACA TTA TAT TAA AAA ATG ATA TGA CAA AT MDR-O2: ATG ATT CGA TAA ATT CAT CTA TAG CAG CAA <b>PCR semi-niché</b>	94°C x 2min 30 x (94°C x 1min, 52°C x 1min, 72°C x 45s), 72°C x 5min, <u>Garder</u> à 4°C
<i>Pfprt</i> K76T PCR 1	CRT-1 : GACGAGCGTTATAGAGAATTA CRT-2 : CCAGTAGTTCCTTGTAAGACC	94°C x 3min 40 x (94°C x 30s, 47°C x 1min, 72°C x 1, 5min), 72°C x 3 min, <u>Garder</u> à 4°C
<i>Pfprt</i> K76T PCR2	CQR-A : TGTGCTCATGTGTTTAACTT CQR-B : CAAAATATAGTTACCAAT	94°C x 5min 30 x (94°C x 30s, 52°C x 1min, 72°C x 1min), 72°C x 3 min, <u>Garder</u> à 4°C
PCR Microsatellites	TA40 Sens : 6FAM- TTTTGGTTTCCAAGGGATTG TA40 antisens : gtgtcttTTAAGGCCACGAGGAAATTG TA60 sens : HEX- CCAAGAGAAAGCGATCCTCA TA60 antisens : gtgtcttTTTTTCCATCATATAAATTGGTATCT TA81 sens : HEX- AGGGAAGGTGAGGAAAAGGA TA81 antisens : gtgtcttTTCATACATTTACACAACACAGG PfPK2 sens HEX- TCCTCAGACTGAAATGCATGA PfK2 antisens : gtgtcttCCTTTCATCGATACTACGATTATTTG	94°C x 5 min 10 x (94°C x 20s, 60°C x 30s, decreasing 0.5°/cycle, 68°C x 25 s), 30 x (94°C x 20s, 55°C x 30s, 68°C x 25s), 68°C x 10 min



### III.4.4.3 Electrophorèse des produits d'amplification

Les produits de la PCR pour *msp1*, *msp2* et les marqueurs de résistance ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5% contenant 7,5µL de bromure d'éthidium (5-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine). Le gel était déposé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TBE 1X (Trizma Boric acid EDTA). Un volume de 2 µL de bleu de charge a été mélangé avec chaque produit de la PCR puis 15 µL de ce mélange a été déposé dans un puits du gel d'électrophorèse. La forte densité du bleu de charge lui permettait de maintenir la solution d'ADN dans le puits d'électrophorèse. L'électrophorèse a été réalisée à une intensité de 350mA sous une tension de 80-90 volts pendant 1h-1h30min. Le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les fragments d'une molécule d'ADN et d'émettre une fluorescence à 300 nm quand il est excité aux rayons ultra-violet (UV). La révélation de l'électrophorèse a été faite sous UV en utilisant un système de documentation des images couplé à un ordinateur donnant la possibilité d'estimer avec précision la taille exacte des bandes d'ADN.

Les produits de la PCR pour microsatellites ont été dilués dans de l'eau ultra pure avant l'électrophorèse. Par la suite on a mélangé 2µL du produit dilué avec 10µL de HI-DI Formamide (highly deionized formamide) et 0.2µL de Genescan 400HD ROX (applied biosystem) puis dénaturer le tout pendant 5 minutes à 95°C. L'électrophorèse capillaire a été réalisée avec un analyseur d'ADN 3730xl (Applied Biosystem) et les allèles ont été mesurés avec un logiciel « GeneMapper » (Applied Biosystem).

### III.4.4.4 Interprétation des résultats

Une bonne réaction de PCR se traduit par la présence de bandes de tailles précises correspondant aux différents contrôles positifs et par l'absence de bande dans le contrôle négatif. La polyclonalité se traduisant par la présence simultanée dans le même extrait des bandes de tailles différentes, car chaque bande représentant un clone ou un allèle. Les marqueurs de polymorphisme *msp1*, *msp2*, TA40, TA60, Pfk2 et TA81 ont été utilisés pour distinguer les parasites recrudescents de ceux nouvellement infectant. Pour un même patient, nous avons comparé le nombre et la position des bandes ou les pics de fragments d'ADN du jour d'inclusion (J0) et du jour d'échec thérapeutique. Les résultats ont été exprimés en terme de « recrudescence », « nouvelle infection » ou « indéterminé ». Le résultat est considéré comme valide lorsqu'il existait au moins une bande d'ADN de l'allèle étudié. Deux allèles ont été considérés identiques lorsqu'ils différaient de seulement 10 paires de base pour *msp1*, *msp2* et d'une seule paire de base pour les microsatellites. Dans de telles situations le parasite

est dit recrudescence (Cattamanchi *et al.*, 2003) . Les marqueurs de résistance des gènes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr* et *pfdhps* ont été interprétés en terme d'infection sauvage, mutant et mixte. Un parasite a été considéré sauvage lorsqu'il présentait uniquement toutes les bandes du témoin sauvage. Il a été considéré mutant lorsqu'il présentait uniquement les bandes du témoin mutant et mixte lorsqu'il présentait les bandes du sauvage et du mutant.

### III.5 CONSIDERATIONS ETHIQUES

Les protocoles de ces études ont reçu les approbations des Comités d'Ethique Institutionnel du Centre Muraz et de l'Université de Californie, San Francisco (USA). Ces études ont été enregistrées sur [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) respectivement sous les numéros IRCTN94367569, IRCTN59761234 et NCT00941785. Par ailleurs tous les participants de ces études, leurs parents ou leurs tuteurs légaux ont manifesté leurs accords de participation aux différentes études et de l'utilisation ultérieure des échantillons collectés par la signature de consentement éclairé. La prise en charge médicale des participants était entièrement gratuite et l'anonymat a été garanti durant toutes les analyses de laboratoire.

### III.6 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les résultats de l'efficacité de la DHA-PQ ont été analysés en intention de traiter et per protocole avec STATA version 11.0. Les seuils de la concentration en PQ au jour 7 utilisés étaient respectivement 30ng/ml et 57ng/ml pour le sang veineux et capillaire. Les tests de chi-deux ( $\chi^2$ ) ou de Fisher exact ont été utilisés pour comparer les différentes proportions. Les variables continues (distributions normales ou transformées en logarithme) ont été comparées en utilisant le test « *t* » de *Student*. Une valeur de probabilité « *p* » <0,05 était considérée comme statistiquement significative. Nous avons utilisé la méthode de survie de *Kaplan Meier* pour estimer le risque de récurrence parasitaire durant la période de suivi.

Pour évaluer la sélection des polymorphismes après le traitement dans notre première étude, nous avons comparé les prévalences de chaque polymorphisme étudié dans 150 (pour *pfcr1* et *pfmdr1*) ou 39 (pour *pfdhfr* et *pfdhps*) échantillons sélectionnés au hasard avant le traitement à celles des parasites causant une nouvelle infection dans la période de 42 jours après le traitement. Dans la deuxième étude, la comparaison des proportions a été faite entre 111 échantillons sélectionnés au hasard et toutes les nouvelles infections. Les données ont été saisies et vérifiées avec SPSS ou EPI Info 6.04 et les analyses ont été faites avec STATA version 8.0. Les analyses de la troisième étude ont consisté à comparer avec SPSS version 17

les prévalences des différents marqueurs de résistance avant la prise de la première dose de TPI à celles des patients ayant successivement reçu les trois doses de TPI.

## IV RESULTATS

### IV.1 SELECTION DES POLYMORPHISMES DE RESISTANCE DE *P. FALCIPARUM* PAR AL, AQ-SP ET NON PAR LA DHA-PQ

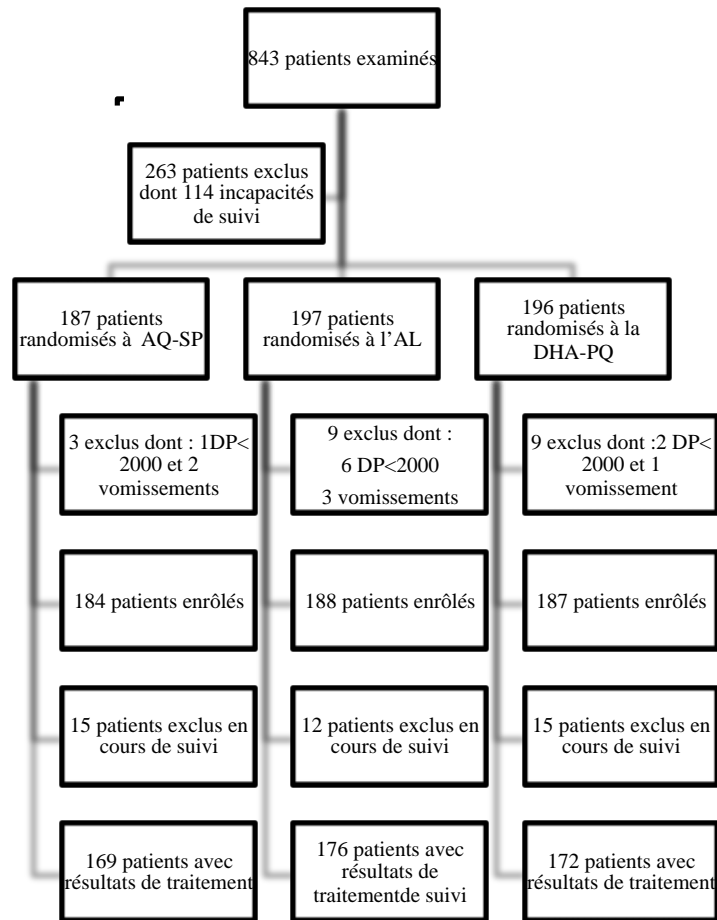
#### IV.1.1 Profils des études et caractéristiques des populations

Les échantillons de cette partie proviennent de trois études cliniques conduites à Bobo-Dioulasso. La première étude comparant en 2006 l'efficacité thérapeutique de AL, AQ-SP et DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple a été réalisée sur un total de 843 patients examinés. Cinq cent quatre vingt (580) patients remplissant les critères d'inclusion ont été randomisés pour recevoir l'AQ-SP, l'AL ou la DHA-PQ. Sur un total de 559 patients ayant reçu le traitement et inclus pour un suivi de 42 jours, seuls 517 ont terminé le suivi avec un résultat de traitement dont 169 patients pour le bras AQ-SP, 176 pour AL et 172 pour DHA-PQ (Figure XII).

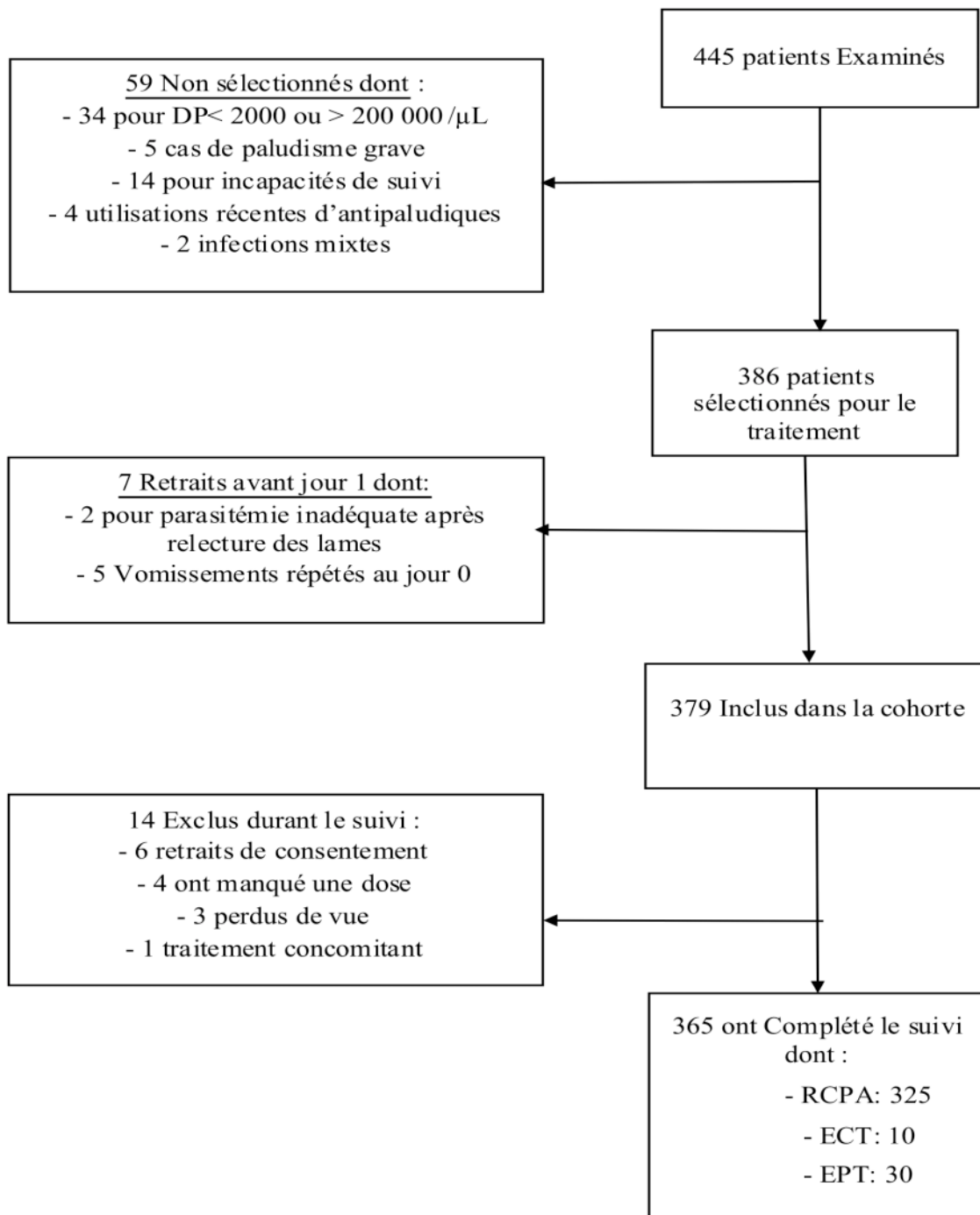
La deuxième étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité et la pharmacocinétique de la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso. Sur un total de 445 participants diagnostiqués avec le paludisme, 386 remplissant les critères d'inclusion ont été enrôlés dans l'étude. Les principales raisons de non inclusion étaient la parasitémie  $<2000 Pf/\mu l$ ,  $>200000 Pf/\mu l$  ou l'incapacité de suivi. Sept participants ont été retirés de l'étude après le jour 1 principalement pour des raisons de vomissements persistants donnant à la fin une cohorte de 379 patients suivis. De cette cohorte, 96,3% ont bénéficié d'un suivi complet (figure XIII). La moyenne d'âge de la population était de 6 ans (0,6 -50 ans) avec 36,0% de la population ayant moins de 5 ans. La dose journalière moyenne de PQ administrée était de 18,5 mg/kg (6,5-24). L'étude de pharmacocinétique a concerné 226 participants âgés de 2-10 ans ayant fourni 226 échantillons de sang capillaire et 198 échantillons de sang veineux au jour 7.

Dans la troisième étude, 1500 enfants âgés de 3-59 mois ont été randomisés 1 :1 au mois d'août 2009 pour recevoir mensuellement (Août, Septembre et Octobre) un traitement préventif à la DHA-PQ (Duocotexin®, Dihydroartémisinine 40 mg -pipéraquline phosphate 320 mg, Holley Cotec, China) ou à l'AQ-SP (Camoquin®, Parke-Davis sirop 60 ml 5ml/mg / Fansidar® Roche 500mg/25 mg comprimés). Pour estimer l'incidence du paludisme chez les enfants ne recevant pas de traitement préventif intermittent (TPI), une cohorte de 250 enfants a été enrôlée et également suivie de la même manière de Septembre à Novembre 2009. Pour

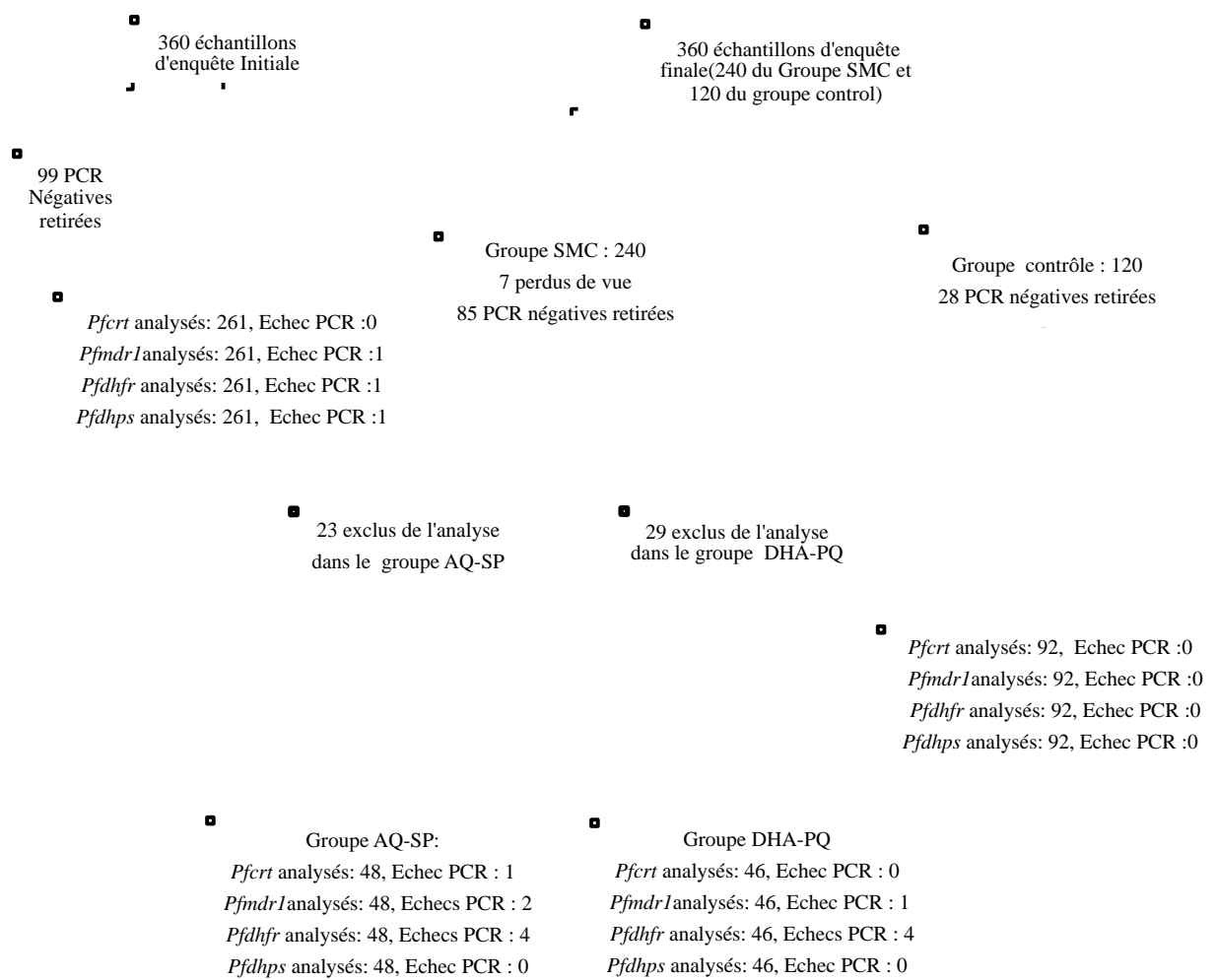
l'analyse de PCR au laboratoire nous avons sélectionné au hasard 120 paires d'échantillons (jour 0 et jour d'enquête finale) dans chaque bras de traitement et 120 dans le bras de Contrôle. Au total, 360 échantillons ont été sélectionnés au hasard pour évaluer la prévalence des polymorphismes avant et à la fin du TPI (figure XIV).



**Figure XII : Profil de l'étude comparant les efficacités thérapeutiques de AL, AQ-SP et DHA-PQ**



**Figure XIII: Profil de l'étude évaluant l'efficacité et la pharmacocinétique de la DHA-P**  
 ETP= Echec Thérapeutique Précoce, ECT=Echec Clinique Tardif, RCPA=Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate,  
 EPT= Echec Parasitologique Tardif



**Figure XIV : Profil de l'analyse de laboratoire de la troisième étude**

#### IV.1.2 Sélection de polymorphismes de gènes de résistance dans les parasites de nouvelles infections dans l'étude randomisée comparant AL, AQ-SP et DHA-PQ<sup>1</sup>

Pour évaluer les différences de proportions de polymorphisme avant le traitement et dans les nouvelles infections, nous avons comparé les proportions de chacun des polymorphismes étudiés dans 150 échantillons sélectionnés au hasard avant le traitement (pour *pfprt* et *pfmdr1*) ou 39 échantillons (pour *pfdhfr* et *pfdhps*) avec celles des parasites de nouvelles infections au cours du suivi de 42 jours. Nous avons évalué les polymorphismes au niveau des gènes *pfprt* (K76T) et *pfmdr1* (N86Y, Y184F, D1246Y) associés à la résistance à la CQ et à l'AQ et ceux au niveau de *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N) et *pfdhps* (A437G, K540E) associés à une diminution de la réponse au traitement à la SP. Nous n'avons pas évalué par contre les mutations au niveau des codons 1034, 1042 de *pfmdr1* et 164 de *pfdhfr* ou encore les altérations du nombre de copies de *pfmdr1* qui sont d'une importance capitale dans certains pays mais qui à notre connaissance n'ont pas encore été observées au Burkina Faso.

Après traitement à l'AL, les nouvelles infections étaient fréquentes en raison probablement de la courte durée de vie de la luméfantine comparée à celle des autres médicaments partenaires de l'artémisinine. Comme précédemment reporté, le traitement à l'AL a sélectionné significativement les génotypes sauvages de *pfprt*-K76, *pfmdr1*- N86 et Y184 et *pfmdr1* (Tableau 6).

Les nouvelles infections après traitement à l'AQ-SP et à la DHA-PQ étaient très peu fréquentes, limitant de ce fait la puissance statistique de l'identification de la sélection de polymorphismes dans les parasites de nouvelles infections. La sélection de génotypes mutants après traitement à l'AQ-SP était significative pour *pfdhfr* 51I, 59R et 108N. Nous avons également noté une sélection non significative de *pfmdr1*- 86Y (Tableau 6).

Le traitement du paludisme à la DHA-PQ n'a pas favorisé de sélection au niveau des polymorphismes étudiés dans les gènes *pfprt* et *pfmdr1*. Il faut cependant noter que la puissance statistique était limitée pour ces analyses puisque seulement 9 nouvelles infections ont été reportées durant le suivi de 42 jours après traitement à la DHA-PQ.

---

<sup>1</sup> Ces résultats ont déjà fait l'objet d'une publication sous la référence : **Somé A.F**, Séré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ, **2010**. Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother.*; 54(5):1949-54



**Tableau 6 : Sélection de polymorphismes après traitements à AL, AQ-SP ou DHA-PQ**

Gènes	SNP <sup>c</sup>	Prévalence (%) polymorphismes avant traitement <sup>a</sup>	Sélection (%) dans les nouvelles infections après traitement avec <sup>b</sup>			Sélection par <sup>d</sup>		
			AL (n=48)	AQ-SP (n=13)	DHA- PQ (n=9)	AL	AQ- SP	DHA- PQ
<i>Pfcr1</i>	K76T	72,7	52,1	76,9	77,8	S (0,008)	Non (0,99)	Non (0,96)
	N86Y	36,0	18,7	61,5	33,3	S (0,025)	Non (0,13)	Non (0,84)
<i>Pfmdr1</i>	Y184F	66,7	45,8	69,2	77,8	S (0,009)	Non (0,91)	Non (0,39)
	D1246Y	9,3	6,2	7,7	0	Non (0,71)	Non (0,71)	Non (0,42)
	S108N	30,8		76,9			M (0,005)	
<i>Pfdhfr</i>	N51I	30,8		61,5			M (0,05)	
	C59R	28,2		76,9			M (0,002)	
<i>Pfdhps</i>	A437G	76,9		69,2			Non (0,41)	
	K540E	0		0			Non	

<sup>a</sup> n=150 pour *pfcr1* et *pfmdr1* ; n=39 pour *pfdhfr* et *pfdhps*

<sup>b</sup> Proportion des infections classées mixtes ou mutants à chaque allèle

<sup>c</sup> Single Nucleotid Polymorphism

<sup>d</sup> valeur indiquant la sélection du type sauvage (S), mutant (M) ou l'absence de sélection (Non). Les valeurs de « p » sont entre parenthèses.

#### IV.1.3 Sélection de polymorphismes de gènes de résistance dans les parasites des nouvelles infections après traitement à la DHA-PQ

Le nombre limité de nouvelles infections après traitement à la DHA-PQ dans notre étude précédente nous a permis d'initier le deuxième essai clinique évaluant l'efficacité et la pharmacocinétique de la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso. Dans cette étude nous avons comparé les proportions de chacun des polymorphismes étudiés dans 111 échantillons sélectionnés au hasard avant le traitement avec celles des parasites de nouvelles infections au cours du suivi de 42 jours. Nous avons également noté l'absence de sélection de polymorphismes de *pfcr1* et *pfmdr1*. Les prévalences de *pfcr1* 76T, *pfmdr1* 86Y, 184F et 1246Y étaient identiques entre les échantillons avant traitement et ceux des nouvelles infections après traitement à la DHA-PQ (Tableau 7).

**Tableau 7 : Sélection de polymorphisme après traitement à la DHA-PQ**

Gènes	SNP	Prévalence (%)		Sélection par la DHA-PQ
		polymorphisme avant le traitement	polymorphisme après le traitement	
<i>Pfcr</i>	K76T	66,7	59,5	Non (0,43)
	N86Y	38,7	40,5	Non (0,85)
<i>Pfmdr1</i>	Y184F	67,6	73,0	Non (0,54)
	D1246Y	3,6	8,1	Non (0,50)

#### IV.1.4 Sélection de polymorphismes de gènes de résistance de *P. falciparum* sous l'effet de la chimioprévention saisonnière du paludisme au Burkina Faso<sup>2</sup>.

Au total, 360 échantillons ont été analysés pour déterminer la prévalence des polymorphismes à la visite initiale. Dans le groupe de traitement préventif à l'AQ-SP, 77/120 participants étaient positifs à la PCR en fin de suivi et 48/77 n'ont point développé de paludisme clinique et ont de ce fait reçu trois rounds de traitement préventif à l'AQ-SP. Dans le groupe de traitement à la DHA-PQ, 71/120 participants étaient positifs à la PCR et 46/71 ont reçu trois rounds successifs de traitement à la DHA-PQ. Tous les échantillons négatifs à la PCR n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des résultats de génotypage (Figure XV). Les polymorphismes ont été évalués dans les gènes *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* et *pfdhps* utilisant la PCR nichée suivie par la digestion enzymatique. Nos résultats montrent de très fortes prévalences de séquences mutantes associées aux résistances à la CQ, à l'AQ (*pfcr*76T, *pfmdr1*-86Y, 184F) et à la SP (*pfdhfr* 51I, 59R et 108N et *pfdhps* 436 et 437). Nous n'avons pas observé de mutation au niveau des codons S1034C et N1042D pour *pfmdr1*, I164L pour *pfdhfr* et 540E pour *pfdhps*. Les mutations au niveau des codons 72-75 de *pfcr* n'ont pas été évaluées en raison de leur absence au Burkina Faso.

Dans le groupe de chimioprévention à l'AQ-SP, la sélection des séquences mutantes était significative pour les mutations *pfcr* 76T, *pfdhfr* 59R et 108N. Dans le groupe de la DHA-PQ, aucune sélection de mutation n'a été reportée au niveau des gènes *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* et *pfdhps*. Nous avons par ailleurs enregistré une légère diminution des prévalences de mutants sauf exception pour la mutation *pfmdr1*-86Y (Tableau 8).

<sup>2</sup> Ces résultats ont fait l'objet d'une publication sous la référence : **Somé AF**, Zongo I, Compaoré YD, Sakandé S, Nosten F, Ouédraogo JB and Rosenthal PJ. Selection of drug resistance-mediating *Plasmodium falciparum* genetic polymorphisms by seasonal malaria chemoprevention in Burkina Faso. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; AAC 02406-14; published ahead of print

**Tableau 8 : Effet de TPI à base de AQ-SP et DHA-PQ sur le polymorphisme génétiques de *P. falciparum***

Genès	SNPs	Prévalence (%) enquête initiale (n* = 261)	Sélection (%) à la fin de l'étude			Valeur de p**		
			AQ-SP (n=48)	DHA-PQ (n=46)	Non TPI (n=92)	AQ-SP	DHA-PQ	Non TPI
<i>Pfcr</i>	K76T	68,5	82,97	65,22	62	<b>0,04</b>	0,66	0,25
<i>pfmdr1</i>	N86Y	29,1	37,5	32,61	33	0,24	0,62	0,52
	Y184F	58,5	58,33	56,52	67	0,98	0,79	0,13
	S1034C	0	0	0	0	1	1	1
	N1042D	0	0	0	0	1	1	1
	D1246Y	7,7	4,17	0	8	0,5	<b>S 0,05</b>	0,97
<i>Pfdhfr</i>	N51I	58,1	69,56	54,55	59	0,14	0,66	0,91
	C59R	54,8	83,33	45,65	43	<b>0,0002</b>	0,25	0,25
	S108N	55	87,23	51,11	53	<b>0,0001</b>	0,62	0,77
	I164L	0	0	0	0	1	1	1
	S436A	35,1	35,42	30,43	34	0,97	0,53	0,8
<i>Pfdhps</i>	A437G	56,8	62,5	69,57	<b>65</b>	0,45	0,1	0,15
	K540E	0	0	0	0	1	1	1

\* nombre d'échantillons analysés

\*\* comparaison des prévalences de chacune des mutations entre l'enquête initiale et l'enquête finale

## IV.2 EFFICACITE ET PHARMACOCINETIQUE DE LA DHA-PQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME SIMPLE AU BURKINA FASO<sup>3</sup>

### IV.2.1 Efficacité du traitement à la DHA-PQ

Après 42 jours de suivi nous avons enregistré 31,3% (10/32) d'infections récurrentes chez les enfants de moins de 2 ans, comparé à 16% (16/106) chez les enfants de 2-4 ans ( $p=0,057$ ), 9,4% (15/160) chez ceux de 5-10 ans ( $p < 0,001$ ) et 0% (0/67) chez les participants de plus de 10 ans ( $p < 0,001$ ; Tableau 9). Parmi les 21 participants sous-dosés, 20 participants avaient des résultats cliniques disponibles. Dix-neuf de ces participants sous-dosés étaient âgés d'au moins 10 ans; tous les participants sous-dosés avaient des gouttes épaisses négatives à la fin du suivi. Un des participants surdosés a eu un échec parasitologique tardif. Parmi les participants ayant expérimenté une infection récurrente, le temps de récurrence parasitaire était de 19 jours chez les moins de 2 ans, 21 jours ceux âgés de 2-4 ans ( $p=0,6$ ) et 34 jours chez ceux âgés de 5-10 ans ( $p=0,01$ ) (Figure XV). Le génotypage de *msp1*, *msp2* et des microsatellites a permis d'identifier seulement 3

<sup>3</sup> Ces résultats ont fait l'objet d'un manuscrit accepté pour publication dans PLOS One sous la référence : Issaka Zongo, **Fabrice A. Somé**, Serge A.M. Somda, Sunil Parikh, Noel Rouamba, Philip J. Rosenthal, Joel Tarning, Niklas Lindegardh, François Nosten and Jean-Bosco Ouédraogo, 2012. Efficacy of Dihydroartemisinin-Piperaquine and day 7 Plasma Piperaquine Concentration in the Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria in African Patients. Numéro de suivi : PONE-D-13-08422R1

recrudescences (tous chez les moins de 5 ans), un résultat indéterminé et 37 nouvelles infections sur un total de 41 épisodes d'infections récurrentes (Tableau 9).

Dans la première étude comparant l'efficacité thérapeutique de AQ-SP Vs AL Vs DHA-PQ, neuf patients ont eu un échec thérapeutique précoce, dont 5 dans le groupe AQSP (2 avec signes de danger [dont 1 avec des convulsions et l'autre avec des vomissements] et 3 avec un paludisme grave [1 avec altération de la conscience et 2 avec jaunisse]) et 2 dans chacun des groupes de traitement AL et DHA-PQ. Les résultats de l'efficacité ont été estimés sur la base du temps de l'échec thérapeutique précoce ou du temps de récurrence parasitaire selon les recommandations de l'OMS. Les résultats ont été évalués après les jours 28 et 42 avec considération ou non du génotypage pour distinguer les recrudescences des nouvelles infections. Considérant les résultats non ajustés par génotypage, les traitements à l'AQSP et à la DHA-PQ étaient plus efficaces que le traitement à AL à la fois au jour 28 et 42 après l'initiation du traitement (tableau 10).

**Tableau 9 : Réponse au traitement en fonction de l'âge**

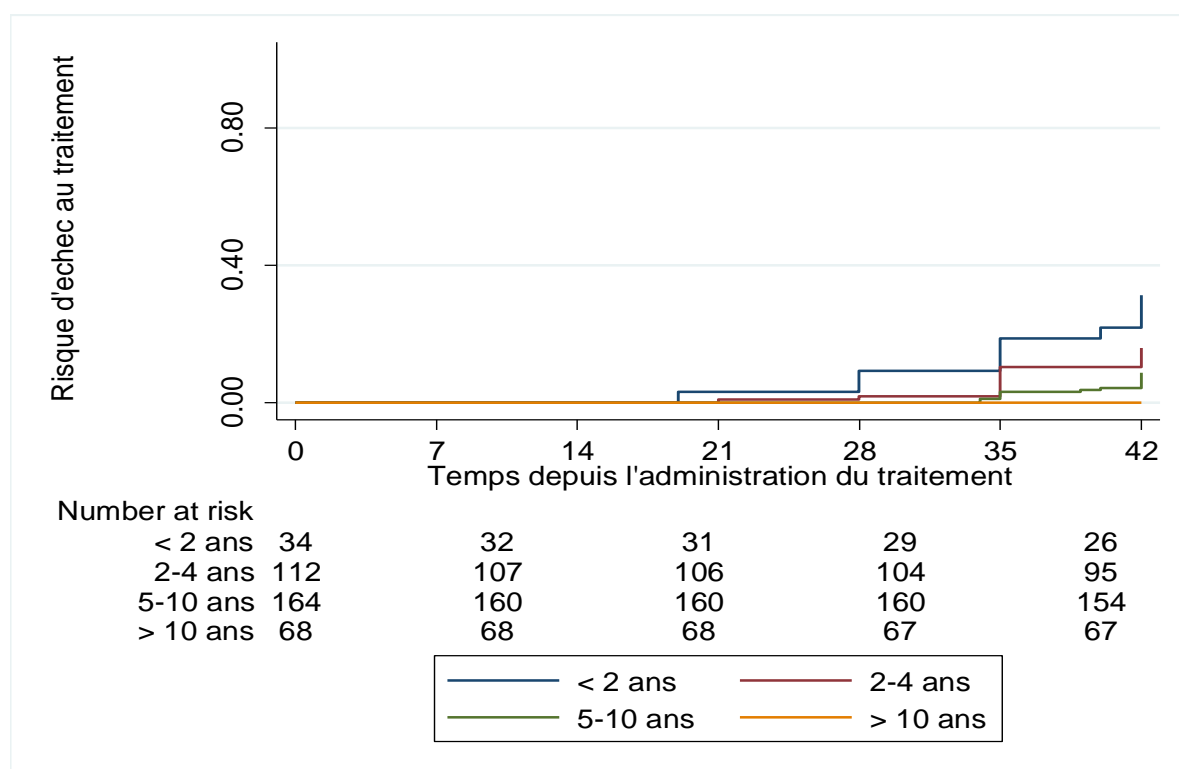
	< 2 ans	2-4 ans	5-10 ans	> 10 ans	Total
Taille de la catégorie	32	106	160	67	365
[PQ] mg/kg/jour (range)	17,8 (15,2-24)	18,9 (11,4-21,8)	18,8 (14,2-24)	16,8 (6,5-19,3)	18,5 (6,5-24)
ETP <sup>a</sup>	0	0	0	0	0
E C T <sup>b</sup>	6 (18,7%)	2 (1,9 %)	3 (1,9%)	0	11 (3%)
EPT <sup>c</sup>	4 (12,5%)	15 (14,1%)	11 (6,9 %)	0	30 (8,2%)
Nombre Total Récurrence	10(31,3%)	16 (16%)	15 (9,4%)	0 (0%)	41(100%)
Recrudescence	2	1	0	0	3
NI <sup>c</sup>	8	15	14	0	37
RCPA <sup>d</sup>	22 (68,7%)	89 (84%)	146 (91,2%)	67 (100%)	324 (88,8%)

a= Echec Therapeutique Précoce, b=Echec Clinique Tardif, c=Nouvelles infections, d=Réponse Clinique et Parasitologique

Adéquate, N=Nombre de patients ; e= Echec Parasitologique Tardif

**Tableau 10: Efficacité thérapeutique de AQ-SP Vs AL Vs DHA-PQ**

Catégorie de risque d'échec	Risque d'échec thérapeutique (95% IC)				Différence de risque (95% IC)				
	Groupe AQ-SP	Groupe AL	Groupe DHA-PQ	AL Vs AQ-SP	<i>p</i>	AL Vs DHA-PQ	<i>p</i>	AQ-SP Vs DHA-PQ	<i>p</i>
Risque sur 28 jours non ajusté par PCR	6,2 (3,5-11,0)	20,1 (14,9-26,7)	2,2 (0,8-5,8)	13,8 (7,0-20,7)	<0,001	17,9 (11,6-24,1)	<0,001	4,0 (0-8,2)	0,06
Risque sur 28 jours ajusté par génotypage	3,9 (1,9-8,0)	3,4 (1,5-7,3)	2,2 (0,8-5,8)	0,1 (-4,4 à 3,3)	0,79	1,1 (-2,3 à 4,6)	0,51	1,7 (-1,9 à 5,2)	0,36
Risque sur 42 jours non ajusté par génotypage	11,6 (7,6-17,4)	30,9 (24,7-38,3)	7,5 (4,4-12,5)	19,4 (11,0-27,7)	<0,001	23,5 (15,6-31,3)	<0,001	4,1 (-2,1 à 10,3)	0,19
Risque sur 42 jours ajusté par génotypage	3,9 (1,9-8,0)	4,1 (2,0-8,5)	2,2 (0,8-5,8)	0,2 (-3,9 à 4,3)	0,91	1,9 (-1,8 à 5,6)	0,32	1,7 (-1,9 à 5,2)	0,36

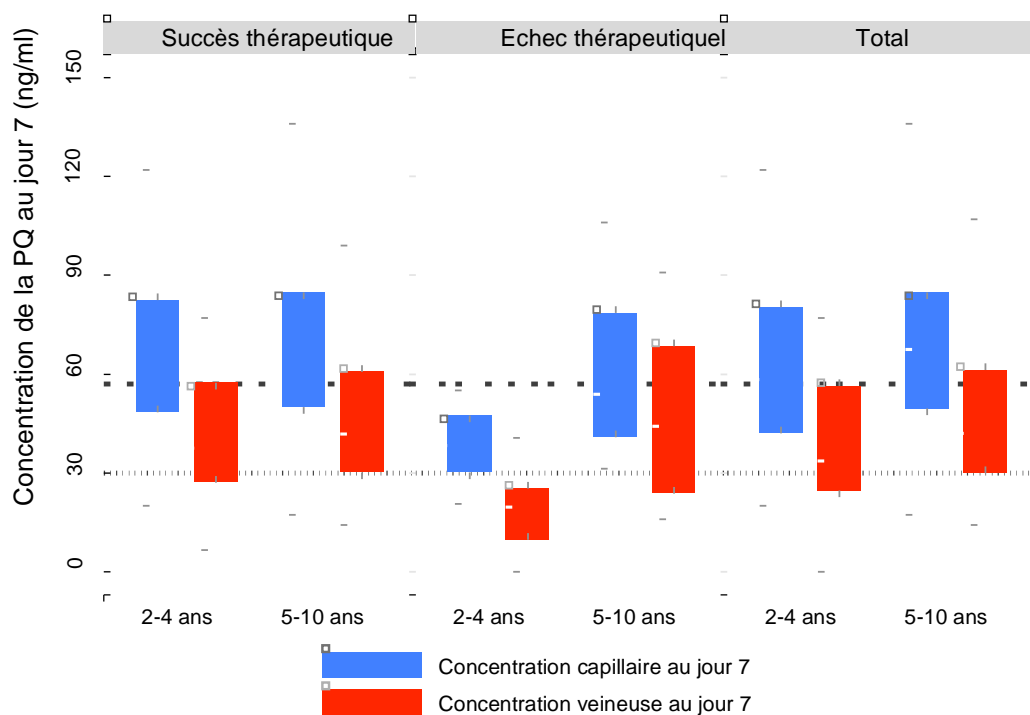


**Figure XV: Estimation du risque d'échec au traitement**

#### IV.2.2 Association entre la concentration plasmatique en PQ et la réponse au traitement à la DHA-PQ

Pour évaluer l'association entre la concentration en PQ au Jour 7 et la réponse au traitement, nous avons collecté du plasma à partir de 226 échantillons de sang capillaire et 198 échantillons de sang veineux prélevés au jour 7 chez les enfants âgés de 2-10 ans. La concentration plasmatique moyenne en PQ au jour 7 était significativement élevée dans le

sang capillaire (67ng/ml [49-84]) comparée à celle du sang veineux (41ng/ml [27-69]) (tableau 10,  $p < 0,001$ ). Dans le sang capillaire comme veineux, la concentration moyenne en PQ au jour 7 chez les enfants de moins de 5 ans était inférieure à celle des enfants de plus de 5 ans ( $p < 0,001$ , tableau 10 et figure XVI). Aussi, les enfants ayant une RCPA avaient une concentration plasmatique moyenne en PQ plus élevée (68 ng/ml [50-85] pour la concentration capillaire et 42 ng/ml [29-59] pour la concentration veineuse) que celle des enfants ayant eu des infections récurrentes (48 ng/ml [36-55] pour la concentration capillaire et 25 ng/ml [19-44] pour la concentration veineuse) (tableau 11,  $p < 0,001$ ).



**Figure XVI: Distribution de la concentration en PQ en fonction de la réponse au traitement**

**Tableau 11 : Concentration en PQ dans le sang capillaire et veineux en fonction de l'âge**

[PQ] ng/ml	2-5 ans n=60	6-10 ans n=126	Total n=186	Valeur de $p$
Sang capillaire	62,2 [45,4-83,3]	67,50 [49,6-84,5]	66,70 [48,5-84,4]	0,258
Sang veineux	34,00 [24,6-56,8]	41,90 [29,8-63,5]	40,95 [27,3-58,9]	0,028
Valeur de $p$	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

**Tableau 12 : Concentration plasmatique en PQ et réponses au traitement**

Médiane [PQ] ng/ml <sup>a</sup>	RCPA (n=165)	Echecs (n=21)	Valeur de $p^b$
Sang capillaire	67,8 [50,4-84,8]	44 [36-55,4]	< 0,001
Sang veineux	41,6 [29,1-59,4]	25,3 [18,6-44,2]	< 0,001
Valeur de $p^c$	< 0,001	< 0,001	

a= Médiane [interquartile], b=test de Wilcoxon Rank sum, c= test de Wilcoxon paired sign Rank

### IV.2.3 Relation entre la présence des marqueurs de résistance et les recrudescences

Sur un total de 365 patients ayant des résultats de traitement à la DHA-PQ disponibles à l'issu des deux études, nous avons enregistré 10,9% (41/ 365) d'infections récurrentes. Après génotypage de *msp1*, *msp2* et de quatre microsatellites seuls trois échantillons (0,92%) ont été classés comme recrudescences. Les marqueurs de résistance des gènes *pfprt* (K76T) et *pfmdr1* (N86Y, Y184F et D1246Y) ont été évalués sur toutes les recrudescences et sur une sélection randomisée de 111 échantillons avant le traitement. Les mutations au niveau des codons 72-75 de *pfprt* et 1034 et 1042 de *pfmdr1* n'ont pas été évaluées à cause de leurs absences au Burkina Faso. Aucune des mutations évaluées au niveau des gènes *pfprt* et *pfmdr1* n'était associée à la recrudescence après traitement à la DHA-PQ (Tableau 12).

**Tableau 13 : Relation entre les mutations génétiques et les recrudescences après traitement à la DHA-PQ**

Mutation	Nombre		$p$
	Recrudescence (n=3)	RCPA (n=111)	
<i>Pfprt</i> 76T	2	74	1
<i>Pfmdr1</i>			
86Y	2	42	0,56
184F	2	75	1
1246Y	0	4	1

RCPA= Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate, n = Nombre de patients,  $p$ = Probabilité

### IV.2.4 Clairance de la fièvre et des parasites, portage de gamétocytes et variation moyenne de l'hémoglobine

A l'inclusion, tous les patients étaient fébriles ou avaient une histoire de fièvre. Respectivement, après les jours 1 et 2, 90 pour-cent et 97,9% des patients n'étaient plus fébriles. Aussi, la clairance parasitaire était de 92,5% après le jour 2 (tableau 13).

Les gamétocytes étaient rares sur la base de la microscopie. A l'inclusion, 7 participants avaient des gamétocytes parmi lesquels 3 ont éliminé leurs gamétocytes au jour 2, trois autres

au jour 21 et le septième au jour 28. A partir du jour 28, aucun gamétoocyte n'a été détecté chez tous les patients suivis.

Nous avons observé une augmentation de l'hémoglobine entre le jour 0 et la fin de suivi. Le gain moyen en hémoglobine était de 1,23g/dl (95% IC [1,0-1,4],  $p < 0,001$ ). A la fin du suivi, la moyenne d'hémoglobine chez les patients RCPA était significativement supérieure à celui des patients ayant eu un échec au traitement (11,9g/dl versus 10,7g/dl,  $p < 0,001$ ).

**Tableau 14 : Evolution de la clairance de la fièvre et de la parasitémie chez les participants**

Jour après initiation du traitement	Nb. De clairance de la fièvre	Proportion	Jour après initiation du traitement	Nb. De clairance de parasite	Proportion
Jour 1 (n=357)	355	93,8%	Day 2 (n=350)	325	92,9%
Jour 2 (n=352)	344	97,7%	Day 3 (n=349)	346	99,1%
Jour 3 (n=351)	345	98,1%	Day 4 (n=227)	226	99,6%

#### IV.2.5 Tolérance et acceptabilité du traitement à la DHA-PQ

Le traitement a été en général bien toléré. Dix neuf patients (6,1%) ont vomit leur première dose de DHA-PQ. Les effets secondaires les plus fréquemment rencontrés étaient le vomissement, les maux de tête et la diarrhée. Aucun effet secondaire nécessitant l'arrêt de traitement n'a été observé (Tableau 14).

**Tableau 15 : Proportion des effets secondaires chez les patients traités à la DHA-PQ**

Signes	Fréquence	Pourcentage
Vomissements dans 30 minutes (n=354)	18	5,1%
Maux de tête (n=278)	15	5,4%
Vomissements (n=355)	22	6,1%
Diarrhées (n=357)	12	3,4%
Anorexie (n=357)	11	3,1%
Faiblesses (n=357)	9	2,5%
Prurits (n=356)	9	2,5%
Nausées (n=294)	4	1,4%



## V DISCUSSION

### V.1 DE LA SELECTION DES POLYMORPHISMES DE RESISTANCE DE *P. FALCIPARUM* PAR AL, AQ-SP ET NON PAR LA DHA-PQ

Notre première étude randomisée nous a permis d'évaluer la pression de sélection de polymorphismes associés à la résistance aux amine-quinoléines et aux antifolates. Comme précédemment reporté dans des études antérieures, nous avons trouvé que AL sélectionne les séquences de types sauvages des gènes *pfprt* et *pfmdr1* et que AQ-SP sélectionne le type mutant dans le gène *pfdhfr*. De nos connaissances, aucune étude antérieure n'a évalué la pression de sélection de la DHA-PQ. Dans cette étude, la PQ qui est structurellement proche de la CQ et l'AQ n'a pas sélectionné les types mutants de *pfprt* ou *pfmdr1* associés à la résistance à la CQ et l'AQ et ou sectionnés par ces antipaludiques. L'analyse d'échantillons supplémentaires de la deuxième étude clinique avec la DHA-PQ a confirmé les résultats trouvés. Ces résultats suggèrent que la PQ n'aurait peut-être pas la même pression de sélection et probablement pas les mêmes mécanismes de résistance que la CQ et l'AQ.

Une des méthodes les plus sensibles permettant d'identifier la sélection des parasites présentant des diminutions de sensibilités aux antipaludiques est d'évaluer l'impact des traitements sur le polymorphisme des parasites récurrents après les traitements. Dans le cas du traitement à la DHA-PQ l'impact de la dihydroartémisinine dans les infections récurrentes est négligeable en raison de la courte durée de sa demi-vie. La demi-vie de la PQ par contre est de 3 à 4 semaines (Hung *et al.*, 2004; Tarning *et al.*, 2008). Les infections récurrentes émergeant ainsi au cours des 42 jours de suivi proviennent indubitablement des parasites qui survivent malgré la persistance d'une certaine dose de PQ. Ces parasites peuvent offrir des indices de marqueurs de résistance.

Le traitement à l'AQ-SP sélectionne les parasites de nouvelles infections portant la mutation *pfmdr1*-86Y mais ne sélectionne pas les autres mutations connues de *pfprt* et *pfmdr1*. Cette sélection limitée pourrait s'expliquer par le fait du nombre réduit de nouvelles infections après traitement à l'AQ-SP. Le traitement à l'AQ-SP sélectionne aussi trois autres mutations courantes du gène *pfdhfr* mais ne sélectionne pas la mutation courante 437G du gène *pfdhps*. Ces résultats corroborent avec ceux d'études antérieures suggérant que les principaux déterminants de la résistance à la SP étaient les mutations *pfdhfr* 59R, sélectionnée par AQ-SP et *pfdhps* 540E, non sélectionnée à cause de sa rareté en Afrique de l'Ouest

(Dorsey *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2009). L'absence de la mutation *pfdhfr* 540E pourrait expliquer l'excellente efficacité de l'AQ-SP au Burkina Faso (Zongo *et al.*, 2007a).

Le traitement à l'AL procure une pression de sélection de direction opposée à celle de l'AQ avec la sélection des séquences de types sauvages aux codons 76 du gène *pfcr1*, 86 et 184 du gène *pfmdr1* comme précédemment reporté (Dokomajilar *et al.*, 2006a; Humphreys *et al.*, 2007; Martensson *et al.*, 2005; Sisowath *et al.*, 2005; Zongo *et al.*, 2007b). Ces allèles de types sauvages sélectionnés sont associés à une diminution de la sensibilité à l'halofantrine et à la méfloquine toutes liées à la luméfanzine. Les échecs au traitement à l'AL étaient rares mais il est probable que les parasites de type sauvage aux gènes *pfcr1* et *pfmdr1* aient plus de possibilité d'éviter l'effet de l'AL que les mutants couramment rencontrés en Afrique (Reed *et al.*, 2000; Valderramos et Fidock, 2006).

Au début des années 1970, la PQ a été largement utilisée en chimio-prophylaxie tout comme en monothérapie en Chine et de nombreux rapports ont par la suite souligné des niveaux inacceptables de résistances cliniques et *in vitro* à la PQ (Chiang *et al.*, 2009). De nos jours, les mécanismes de résistance à la PQ demeurent inconnus. Dans cette dernière décennie, la PQ et la DHA ont été combinées pour former une CTA (DHA-PQ). Des études récentes ont démontré une excellente efficacité de la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple avec très peu de recrudescences et un effet prophylactique post-traitement significatif avec moins de nouvelles infections après le traitement comparé à AQ-SP ou à AL (Hasugian *et al.*, 2007; Kanya *et al.*, 2007; Karema *et al.*, 2006; Yeka *et al.*, 2008; Zongo *et al.*, 2007b). La DHA-PQ est donc un des meilleurs CTA pour le contrôle du paludisme à *P. falciparum*. Cependant, l'inquiétude demeure au vu de la large distribution de la résistance à la PQ de par le passé et la forte pression de sélection des parasites résistants par ce médicament à longue durée de vie. L'évaluation de plus de 500 échantillons provenant de patients traités à la DHA-PQ contre le paludisme simple montre qu'au contraire des résultats de la CQ et l'AQ, le traitement à la DHA-PQ ne sélectionne pas les parasites avec les mutations des gènes *pfcr1* et *pfmdr1* associées aux résistances à la CQ et à l'AQ. Des études conduites à Madagascar (Deloron *et al.*, 1985) et au Cameroun (Basco et Ringwald, 2003) ont montré que la PQ était aussi bien efficace contre les parasites sensibles comme résistants à la CQ bien que certaines études antérieures en Chine aient reporté une résistance croisée entre ces médicaments (Davis *et al.*, 2005). Une étude récente sur des isolats de laboratoire a montré que la diminution de la réponse au traitement à la PQ était associée à la mutation *pfcr1* 76T et non aux polymorphismes courants de *pfmdr1* bien que les 11 isolats étudiés avaient une marge étroite de sensibilité (Muangnoicharoen *et al.*, 2009). L'étude sur les

isolats de terrain en Ouganda a montré l'existence d'une corrélation entre les sensibilités à la CQ, la mono-déséthylamodiaquine et la quinine mais non la PQ (Nsoby *et al.* , 2007).

L'ensemble de ces résultats suggère que contrairement à l'AQ, la DHA-PQ ne sélectionne pas rapidement les polymorphismes de résistance. La PQ pourrait ne pas sélectionner rapidement ces polymorphismes parce que ceux-ci ne sont pas associés à la résistance à ce médicament. La PQ qui a un poids moléculaire (536g/mol) plus élevé que l'AQ (465 g/mol) ou la CQ (320g/mol) pourrait de ce fait être incapable d'utiliser les mêmes transporteurs que les autres 4-amino-quinoléines pour atteindre son site d'action. Aussi, comme le mécanisme d'action de la PQ n'est pas connu, il est possible que ce médicament agisse dans un endroit autre que celui de la CQ et l'AQ et donc que son action ne soit pas affectée par une altération des gènes *pfcr1* et *pfmdr1*, tous deux codant pour les protéines de transport dans la membrane de la vacuole digestive.

La chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) autrefois appelée traitement préventif intermittent de l'enfant (TPIe) a montré des avantages significatifs dans le contrôle du paludisme chez les enfants (Bojang *et al.*, 2010; Dicko *et al.*, 2011; Konate *et al.*, 2011). La CPS est une stratégie prometteuse pour le contrôle du paludisme en Afrique de l'Ouest. Elle est de nos jours recommandée par l'OMS en zone de forte transmission saisonnière du paludisme dans toute la sous-région du Sahel. La CPS consiste en un traitement complet d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine (AQ+SP) administrés aux enfants âgés de 3 à 59 mois à intervalles réguliers d'un mois, commençant au début de la saison de transmission et en donnant au maximum quatre doses pendant celle-ci. Dans l'étude clinique ayant fourni les échantillons pour ce travail, l'administration de la CPS durant trois mois chez les enfants de 3-59 mois offre une protection de 83% pour AQ-SP et 77% pour la DHA-PQ ( Zongo, résultats non publiés). Cependant, il demeurerait incertain si l'utilisation régulière de AQ-SP ou DHA-PQ en CPS favoriserait la sélection des polymorphismes conférant la résistance du parasite aux antipaludiques. Pour évaluer la sélection des polymorphismes de résistance, nous avons comparé les génotypes des parasites collectés à l'inclusion et un mois après la troisième dose mensuelle de la CPS avec AQ-SP et DHA-PQ. Nos résultats nous montrent encore que contrairement à la CPS à la DHA-PQ, les parasites provenant des enfants ayant reçu la CPS à l'AQ-SP sélectionnent de façon significative les séquences mutantes des gènes *pfcr1* et *pfdhfr*.

La sélection de la mutation *pfcr1 76T* à l'issue de la CPS à l'AQ-SP soutient ainsi le rôle spécifique que joue cette mutation dans la résistance à l'AQ (Dokomajilar *et al.* , 2006b). La CPS à l'AQ-SP sélectionne aussi les mutations *pfdhfr 59R* et *108N* toutes deux connues pour

leur association à la résistance à la SP. Sans être sélectionnées par la CPS à l'AQ-SP, les mutations *pfdhfr* 51I, *pfdhps* 436S et 437G étaient courantes. Aucune mutation n'a cependant été reportée au niveau de *pfdhfr* 164 et *pfdhps* 540. Ces résultats qui corroborent avec ceux trouvés dans d'autres études en Afrique (Djimde *et al.*, 2008; Dokomajilar *et al.*, 2006a; Nsohya *et al.*, 2007) soulignent le rôle que pourraient jouer ces polymorphismes dans la résistance à l'AQ et à la SP.

La sélection des séquences mutantes de *pfcr* et *pfdhfr* pourrait être expliquée respectivement par la large utilisation de l'AQ en monothérapie comme en combinaison avec l'AS et par la large utilisation de la SP à la suite de l'apparition de la résistance à la CQ. On ne peut de ce fait pas exclure que la CPS à l'AQ-SP ait contribué à la sélection des parasites porteurs de ces marqueurs de résistance. L'absence de sélection des mutations 86Y et 184F du gène *pfmdr1* pourrait être expliquée par le nombre réduit d'échantillons analysés. AQ et SP demeurent efficaces dans le contrôle du paludisme au Burkina Faso et cela se confirme par l'absence des mutations au niveau des codons 1034 et 1042 de *pfmdr1* et 164 de *pfdhfr* et 540 de *pfdhps*.

Tous les résultats de cette étude ont une implication pour l'utilisation des nouveaux antipaludiques dans le contrôle du paludisme au Burkina Faso. Actuellement, AL et AS-AQ sont les traitements de première ligne recommandés contre le paludisme simple au Burkina Faso comme dans la plupart des pays Africains. AL est efficace mais dans les zones de transmission intense, la courte demi-vie de la luméfantine (4 jours) favorise les nouvelles infections quelques jours après le traitement. En Afrique de l'Est, AS-AQ est significativement moins efficace que AL (Attaran *et al.*, 2006; Dorsey *et al.*, 2007) probablement à cause de la forte prévalence des parasites résistants à l'AQ dans cette région. Au Burkina Faso, une étude conduite entre septembre 2008 et Janvier 2010 reporte que AS-AQ est aussi efficace que AL dans le traitement du paludisme simple (Tinto *et al.*, 2014). Cependant, la toxicité de l'AQ est d'une préoccupation depuis de nombreuses années de même que les rapports fréquents de neutropénie chez les patients VIH positifs (Gasasira *et al.*, 2008) ou VIH négatifs (Bell *et al.*, 2008), les neutropénies récurrentes chez les enfants traités avec AQ-SP de façon répétée (Maiteki-Sebuguzi *et al.*, 2008), les neutropénies et transaminases chez les volontaires traités avec AQ. La DHA-PQ est une CTA mieux tolérée avec une efficacité excellente et une longue prophylaxie post-traitement. Cependant, la longue durée de demi-vie de la PQ pourrait également favoriser la sélection des parasites résistants quand les nouvelles infections se produisent au moment où la DHA a été éliminée et qu'une faible concentration en PQ persiste dans le sang.

La relation entre la pharmacocinétique, la sélection de la résistance et autres facteurs est complexe (Stepniewska et White, 2008) et il est incertain à quel moment la résistance à la PQ pourrait avoir un impact sur l'efficacité de ces antipaludiques en Afrique. Il serait bien d'envisager à l'avenir, l'ajout d'un autre médicament de longue demi-vie à la DHA-PQ en vue d'empêcher la sélection des parasites résistants à la PQ. Nos résultats actuels montrent que la DHA-PQ ne sélectionne pas immédiatement les polymorphismes associés aux résistances de CQ et AQ. La DHA-PQ pourrait donc rester efficace malgré la propagation de la résistance aux autres amino-quinoléines mais le mécanisme de résistance à la PQ demeure inconnu et aucun marqueur moléculaire permettant d'identifier les parasites ayant une sensibilité diminuée n'est disponible. La priorité demeure ainsi la surveillance de la résistance par la mesure de la sensibilité *in vitro* des parasites et l'identification des mécanismes de résistance à la PQ.

## V.2 DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE LA DHA-PQ ET DE LA PHARMACOCINETIQUE DE LA PQ DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME SIMPLE AU BURKINA FASO

L'Objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de la DHA-PQ dans le traitement du paludisme simple et la concentration en PQ au jour 7 comme un déterminant de l'efficacité. La DHA-PQ a montré une excellente efficacité (>99.9 après correction par PCR) avec de bonnes tolérance et sécurité bien qu'il y ait eu près de 20% d'échec (généralement des nouvelles infections) chez les enfants de moins de 5 ans. Les échecs reportés étaient dans la plupart des cas associés à une faible concentration en PQ, particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. Ainsi, la concentration plasmatique en PQ au jour 7 était plus faible chez les patients ayant eu des infections récurrentes. Les patients ayant une concentration en PQ inférieure à 57 ng/ml (seuil établi) avaient trois fois le risque d'infection récurrente. La relation entre le risque d'échec au traitement chez les jeunes enfants et la faible concentration de la PQ dans le sang souligne la nécessité de modifier les doses recommandées pour cette combinaison dans ce groupe d'âge.

L'efficacité de la DHA-PQ reportée dans cette étude corrobore avec celle reportée par la même équipe (Zongo *et al.* , 2007a) et avec celles d'autres études en Afrique (Arinaitwe *et al.*, 2009; Bassat *et al.*, 2009; Nankabirwa *et al.*, 2010) . L'utilisation de la DHA-PQ présente beaucoup plus d'avantages que celle des autres CTA. Premièrement, dans certaines parties de l'Afrique, la DHA-PQ est plus efficace que l'artésunate-amodiaquine (AS-AQ)(Karema *et al.* , 2006) ou l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (AS-SP). Deuxièmement, elle est probablement mieux tolérée que les CTA telles que AS-AQ ou artésunate-méfloquine bien qu'il n'y ait pas de résultats de comparaison directe de ces régimes thérapeutiques chez les enfants africains. Troisièmement, le traitement à la DHA-PQ est plus simple avec une seule dose par jour contre deux doses par jour pour AL. Quatrièmement, à cause de la longue demi-vie de la PQ, la DHA-PQ présente un effet prophylactique post-traitement prolongé se traduisant par des faibles taux d'échecs tardifs dus aux nouvelles infections (Bassat *et al.* , 2009; Zongo *et al.* , 2007a). En considérant tous ces avantages, la DHA-PQ pourrait être la CTA optimale pour le traitement du paludisme simple dans les zones de transmissions intenses. Elle devrait de ce fait être considérée comme un important antipaludique dans le traitement du paludisme simple. Bien-que la DHA-PQ soit certes bien tolérée dans cette étude, au moins 5% des patients ont vomit leur traitement dans les 30 premières minutes suivant l'administration, ce qui est rarement reporté dans l'évaluation de la tolérance de la

DHA-PQ (Zongo *et al.* , 2007a). La tolérance est un facteur clé pour l'acceptabilité du régime thérapeutique par les enfants et les mères, et doit de ce fait être revue dans le but d'une meilleure adhérence au traitement.

Les cas de nouvelles infections se produisaient environ trois semaines après le traitement correspondant ainsi à la demi-vie de la PQ qui est approximativement estimée à 23,2 jours. L'avantage de la DHA-PQ est son action rapide sur la biomasse des parasites mais son inconvénient est que cette combinaison devient presque une monothérapie quelques heures après l'initiation du traitement. L'efficacité de la DHA-PQ est donc excellente mais les infections récurrentes au cours des 42 jours de suivi sont fréquentes, particulièrement chez les petits enfants. Ces infections récurrentes étaient associées à une faible concentration plasmatique en PQ. L'optimisation de la dose chez les jeunes enfants serait donc idéale pour combler le manque en concentration plasmatique de la PQ dans ce groupe. Après le génotypage des parasites récurrents par la PCR, nous avons enregistré seulement trois recrudescences. Ces recrudescences pourraient être dues à la résistance au traitement, à des erreurs de classification des résultats de génotypage ou encore à des facteurs de l'hôte du parasite. Aucun des marqueurs de résistance évalués n'a été associé à la recrudescence des parasites. Cependant, il est à noter que le nombre limité de recrudescences réduit la puissance statistique de l'analyse de l'association entre les marqueurs de résistance et les recrudescences après traitement à la DHA-PQ. La présence de parasites sauvages dans les infections recrudescences suggère l'existence d'autres facteurs favorisant la survie des parasites sous l'effet de la pression de la DHA-PQ.

## VI CONCLUSION

Les résultats de nos travaux montrent que la DHA-PQ a une excellente efficacité avec de bonnes tolérance et sécurité dans le traitement du paludisme simple. Les échecs au traitement rapportés sont très souvent liés à une faible concentration en PQ, particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. La relation entre le risque d'échec au traitement chez les jeunes enfants et la faible concentration de la PQ dans le sang souligne la nécessité de modifier les doses recommandées pour cette combinaison dans ce groupe d'âge.

En plus de son efficacité dans le traitement du paludisme simple, la DHA-PQ ne sélectionne pas immédiatement les polymorphismes associés aux résistances de CQ, AQ et SP sur l'ensemble de nos trois études conduites. Avec cet avantage additionnel la DHA-PQ pourrait demeurer efficace en dépit de la propagation de la résistance aux autres amino-quinoléines. Par ailleurs, le mécanisme de résistance à la PQ demeure inconnu et aucun marqueur moléculaire permettant d'identifier les parasites avec une diminution de sensibilité n'est disponible. En attendant l'ajout d'un autre médicament de longue durée d'action pour minimiser la sélection des parasites résistants à la PQ, la surveillance de la résistance demeure ainsi une grande priorité.



## VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A-Elbasit I. E., ElGhazali G., TM A. E., Hamad A. A., Babiker H. A., Elbashir M. I. and Giha H. A. (2007). "Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P. falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission." *Parasitol Res* **102**(1): 29-34.
- Adjuik M., Agnamey P., Babiker A., Borrmann S., Brasseur P., Cisse M., Cobelens F., Diallo S., Faucher J. F., Garner P., Gikunda S., Kremsner P. G., Krishna S., Lell B., Loolpapit M., Matsiegui P. B., Missinou M. A., Mwanza J., Ntoumi F., Olliaro P., Osimbo P., Rezbach P., Some E. and Taylor W. R. (2002). "Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial." *Lancet* **359**(9315): 1365-1372.
- 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 C. M., Bout D. M., Menard S., Rogers W. O., Genton B., Fandeur T., Miotto O., Ringwald P., Le Bras J., Berry A., Barale J. C., Fairhurst R. M., Benoit-Vical F., Mercereau-Puijalon O. and Menard D. (2014). "A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria." *Nature* **505**(7481): 50-55.
- Arinaitwe E., Sandison T. G., Wanzira H., Kakuru A., Homsy J., Kalamya J., Kanya M. R., Vora N., Greenhouse B., Rosenthal P. J., Tappero J. and Dorsey G. (2009). "Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for falciparum malaria: a longitudinal, randomized trial in young Ugandan children." *Clin Infect Dis* **49**(11): 1629-1637.
- Armstrong Schellenberg J. R., Shirima K., Maokola W., Manzi F., Mrisho M., Mushi A., Mshinda H., Alonso P., Tanner M. and Schellenberg D. M. (2010). "Community effectiveness of intermittent preventive treatment for infants (IPTi) in rural southern Tanzania." *Am J Trop Med Hyg* **82**(5): 772-781.
- Attaran A., Barnes K. I., Bate R., Binka F., d'Alessandro U., Fanello C. I., Garrett L., Mutabingwa T. K., Roberts D., Sibley C. H., Talisuna A., Van Geertruyden J. P. and Watkins W. M. (2006). "The World Bank: false financial and statistical accounts and medical malpractice in malaria treatment." *Lancet* **368**(9531): 247-252.
- Babiker H. A., Lines J., Hill W. G. and Walliker D. (1997). "Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa." *Am J Trop Med Hyg* **56**(2): 141-147.
- Baird J. K. and Snow R. W. (2007). "Acquired immunity in a holoendemic setting of *Plasmodium falciparum* and *p. Vivax* malaria." *Am J Trop Med Hyg* **76**(6): 995-996.
- Basco L. K. and Ringwald P. (2003). "In vitro activities of piperaquine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(4): 1391-1394.
- Bassat Q., Mulenga M., Tinto H., Piola P., Borrmann S., Menendez C., Nambozi M., Valea I., Nabasumba C., Sasi P., Bacchieri A., Corsi M., Ubben D., Talisuna A. and D'Alessandro U. (2009). "Dihydroartemisinin-piperaquine and artemether-lumefantrine for treating uncomplicated malaria in African children: a randomised, non-inferiority trial." *PLoS One* **4**(11): e7871.
- Bell D. J., Nyirongo S. K., Mukaka M., Zijlstra E. E., Plowe C. V., Molyneux M. E., Ward S. A. and Winstanley P. A. (2008). "Sulfadoxine-pyrimethamine-based combinations for malaria: a randomised blinded trial to compare efficacy, safety and selection of resistance in Malawi." *PLoS One* **3**(2): e1578.

- Bernabeu M., Gomez-Perez G. P., Sissoko S., Niambele M. B., Haibala A. A., Sanz A., Thera M. A., Fernandez-Becerra C., Traore K., Alonso P. L., Bassat Q., Portillo H. A. and Doumbo O. (2012). "Plasmodium vivax malaria in Mali: a study from three different regions." *Malar J* **11**(1): 405.
- Boete C. (2009). "Anopheles mosquitoes: not just flying malaria vectors... especially in the field." *Trends Parasitol* **25**(2): 53-55.
- Bojang K., Akor F., Bittaye O., Conway D., Bottomley C., Milligan P. and Greenwood B. (2010). "A randomised trial to compare the safety, tolerability and efficacy of three drug combinations for intermittent preventive treatment in children." *PLoS One* **5**(6): e11225.
- Bray P. G., Martin R. E., Tilley L., Ward S. A., Kirk K. and Fidock D. A. (2005). "Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance." *Mol Microbiol* **56**(2): 323-333.
- Brenier-Pinchart M. P., Pinel C., Croissonier A., Brion J. P., Faure O., Ponard D. and Ambroise-Thomas P. (2000). "Diagnosis of malaria in non-endemic countries by the ParaSight-F test." *Am J Trop Med Hyg* **63**(3-4): 150-152.
- Bronner U., Divis P. C., Farnert A. and Singh B. (2009). "Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo." *Malar J* **8**: 15.
- Bruce-Chwatt L. J., Gilles H. M. and Warrell D. A. (1993). *Bruce-Chwatt's essential malariology*. London, Arnold.
- Bruce-Chwatt L. J., Black R. H., Canfield C. J., Clyde D. F., Peters W., Wernsdorfer W. H. and World Health Organization. (1986). *Chemotherapy of malaria*. Geneva, World Health Organization.
- Camara B., Kantambadouno J. B., Martin-Blondel G., Berry A., Alvarez M., Benoit-Vical F., Delmont J., Bouchaud O. and Marchou B. (2009). "[Hyperreactive malarial splenomegaly: three clinical cases and literature review]." *Med Mal Infect* **39**(1): 29-35.
- Cattamanchi A., Kyabayinze D., Hubbard A., Rosenthal P. J. and Dorsey G. (2003). "Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of *msp-1*, *msp-2*, and *glurp*." *Am J Trop Med Hyg* **68**(2): 133-139.
- Chiang A. N., Valderramos J. C., Balachandran R., Chovatiya R. J., Mead B. P., Schneider C., Bell S. L., Klein M. G., Huryn D. M., Chen X. S., Day B. W., Fidock D. A., Wipf P. and Brodsky J. L. (2009). "Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*." *Bioorg Med Chem* **17**(4): 1527-1533.
- Chitnis C. E. and Sharma A. (2008). "Targeting the Plasmodium vivax Duffy-binding protein." *Trends Parasitol* **24**(1): 29-34.
- Colin L., Mallie M. and Bastide J. M. (2000). "Diagnostic rapide du paludisme par la recherche d'." *Rev Fr Lab* **319**: 59-64.
- Cooper R. A., Ferdig M. T., Su X. Z., Ursos L. M., Mu J., Nomura T., Fujioka H., Fidock D. A., Roepe P. D. and Wellems T. E. (2002). "Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*." *Mol Pharmacol* **61**(1): 35-42.
- Costantini C., Sagnon N., Ilboudo-Sanogo E., Coluzzi M. and Boccolini D. (1999). "Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso." *Parassitologia* **41**(4): 595-611.

- Davis T. M., Hung T. Y., Sim I. K., Karunajeewa H. A. and Ilett K. F. (2005). "Piperaquine: a resurgent antimalarial drug." Drugs **65**(1): 75-87.
- de Gentile L. (2008). "[Management of malaria for children in France in 2008]." Arch Pediatr **15**(9): 1507-1512.
- De Gentile L. and F. G. (2000). Le paludisme d'importation: diagnostic au laboratoire. Rev Fr Lab. **321**: 9.
- de Monbrison F., Angei C., Staal A., Kaiser K. and Picot S. (2003). "Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction." Trans R Soc Trop Med Hyg **97**(4): 387-390.
- Delaunay P., Estran-Pomares C. and Marty P. (2008). "[Malaria diagnosis: thickdrop and bloodsmear examination, and rapid test]." Med Mal Infect **38 Suppl 2**: S121-123.
- Deloron P., Le Bras J., Ramanamirija J. A. and Coulanges P. (1985). "*Plasmodium falciparum* in Madagascar: *in vivo* and *in vitro* sensitivity to seven drugs." Ann Trop Med Parasitol **79**(4): 357-365.
- Denis M. B., Tsuyuoka R., Poravuth Y., Narann T. S., Seila S., Lim C., Incardona S., Lim P., Sem R., Socheat D., Christophel E. M. and Ringwald P. (2006). "Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia." Trop Med Int Health **11**(9): 1360-1366.
- Dicko A., Diallo A. I., Tembine I., Dicko Y., Dara N., Sidibe Y., Santara G., Diawara H., Conare T., Djimde A., Chandramohan D., Cousens S., Milligan P. J., Diallo D. A., Doumbo O. K. and Greenwood B. (2011). "Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Mali: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." PLoS Med **8**(2): e1000407.
- Dinglasan R. R., Alaganan A., Ghosh A. K., Saito A., van Kuppevelt T. H. and Jacobs-Lorena M. (2007). "*Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15882-15887.
- Djimde A., Doumbo O. K., Cortese J. F., Kayentao K., Doumbo S., Diourte Y., Dicko A., Su X. Z., Nomura T., Fidock D. A., Wellems T. E., Plowe C. V. and Coulibaly D. (2001). "A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria." N Engl J Med **344**(4): 257-263.
- Djimde A. A., Fofana B., Sagara I., Sidibe B., Toure S., Dembele D., Dama S., Ouologuem D., Dicko A. and Doumbo O. K. (2008). "Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali." Am J Trop Med Hyg **78**(3): 455-461.
- Dokomajilar C., Nsohya S. L., Greenhouse B., Rosenthal P. J. and Dorsey G. (2006a). "Selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic." Antimicrob Agents Chemother **50**(5): 1893-1895.
- Dokomajilar C., Lankoande Z. M., Dorsey G., Zongo I., Ouedraogo J. B. and Rosenthal P. J. (2006b). "Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso." Am J Trop Med Hyg **75**(1): 162-165.
- Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A. P., Tarning J., Lwin K. M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S. J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S. S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N. P., Lindegardh N.,

- Socheat D. and White N. J. (2009). "Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria." N Engl J Med **361**(5): 455-467.
- Doolan D. L., Dobano C. and Baird J. K. (2009). "Acquired immunity to malaria." Clin Microbiol Rev **22**(1): 13-36, Table of Contents.
- Dorsey G., Dokomajilar C., Kiggundu M., Staedke S. G., Kanya M. R. and Rosenthal P. J. (2004). "Principal role of dihydropteroate synthase mutations in mediating resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in single-drug and combination therapy of uncomplicated malaria in Uganda." Am J Trop Med Hyg **71**(6): 758-763.
- Dorsey G., Staedke S., Clark T. D., Njama-Meya D., Nzarubara B., Maiteki-Sebuguzi C., Dokomajilar C., Kanya M. R. and Rosenthal P. J. (2007). "Combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: a randomized trial." Jama **297**(20): 2210-2219.
- Duffy P. E. (2007). "*Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia." Parasitology **134**(Pt 13): 1877-1881.
- Duraisingh M. T. and Cowman A. F. (2005). "Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance." Acta Trop **94**(3): 181-190.
- Felger I. and Beck H. P. (2008). "Fitness costs of resistance to antimalarial drugs." Trends Parasitol **24**(8): 331-333.
- Fenton B., Clark J. T., Khan C. M., Robinson J. V., Walliker D., Ridley R., Scaife J. G. and McBride J. S. (1991). "Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Mol Cell Biol **11**(2): 963-971.
- Fidock D. A., Nomura T., Talley A. K., Cooper R. A., Dzekunov S. M., Ferdig M. T., Ursos L. M., Sidhu A. B., Naude B., Deitsch K. W., Su X. Z., Wootton J. C., Roepe P. D. and Wellems T. E. (2000). "Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance." Mol Cell **6**(4): 861-871.
- Figueiredo P., Benchimol C., Lopes D., Bernardino L., do Rosario V. E., Varandas L. and Nogueira F. (2008). "Prevalence of *pfmdr1*, *pfCRT*, *pfDHFR* and *pfDHPS* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola." Malar J **7**: 236.
- Gasasira A. F., Kanya M. R., Achan J., Mebrahtu T., Kalyango J. N., Ruel T., Charlebois E., Staedke S. G., Kekitiinwa A., Rosenthal P. J., Havlir D. and Dorsey G. (2008). "High risk of neutropenia in HIV-infected children following treatment with artesunate plus amodiaquine for uncomplicated malaria in Uganda." Clin Infect Dis **46**(7): 985-991.
- Gentilini M. (1993). Le paludisme. Paris.
- Ghosh A. K. and Jacobs-Lorena M. (2009). "*Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland." Curr Opin Microbiol **12**(4): 394-400.
- Greenwood B. M., Bojang K., Whitty C. J. and Targett G. A. (2005). "Malaria." Lancet **365**(9469): 1487-1498.
- Gregson A. and Plowe C. V. (2005). "Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates." Pharmacol Rev **57**(1): 117-145.
- Grobusch M., Hanscheid T., Zoller T., Jelinek T. and Burchard G. (2002). "Rapid immunochromatographic detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **21**: 818-820.
- Guindo A., Fairhurst R. M., Doumbo O. K., Wellems T. E. and Diallo D. A. (2007). "X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria." PLoS Med **4**(3): e66.

- Guinko S. (1984). La végétation de la Haute Volta. Thèse de doctorat ès sciences naturelles, , Université de Bordeaux III.
- Gwamaka M., Kurtis J. D., Sorensen B. E., Holte S., Morrison R., Mutabingwa T. K., Fried M. and Duffy P. E. (2012). "Iron deficiency protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria and death in young children." Clin Infect Dis **54**(8): 1137-1144.
- Hance P., Garnotel E., De Pina J. J., Vedy S., Ragot C., Chadli M. and Morillon M. (2005). "[Rapid immunochromatographic tests for detection of malaria: principles and strategies for use]." Med Trop (Mars) **65**(4): 389-393.
- Hanscheid T. and Grobusch M. P. (2002). "How useful is PCR in the diagnosis of malaria?" Trends Parasitol **18**(9): 395-398.
- Happi C. T., Gbotosho G. O., Folarin O. A., Bolaji O. M., Sowunmi A., Kyle D. E., Milhous W., Wirth D. F. and Oduola A. M. (2006). "Association between mutations in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria." Am J Trop Med Hyg **75**(1): 155-161.
- Hastings I. M. and Mackinnon M. J. (1998). "The emergence of drug-resistant malaria." Parasitology **117 ( Pt 5)**: 411-417.
- Hasugian A. R., Purba H. L., Kenangalem E., Wuwung R. M., Ebsworth E. P., Maristela R., Penttinen P. M., Laihad F., Anstey N. M., Tjitra E. and Price R. N. (2007). "Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria." Clin Infect Dis **44**(8): 1067-1074.
- Hay S. I., Guerra C. A., Gething P. W., Patil A. P., Tatem A. J., Noor A. M., Kabaria C. W., Manh B. H., Elyazar I. R., Brooker S., Smith D. L., Moyeed R. A. and Snow R. W. (2009). "A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007." PLoS Med **6**(3): e1000048.
- Holmgren G., Gil J. P., Ferreira P. M., Veiga M. I., Obonyo C. O. and Bjorkman A. (2006). "Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of pfcr1 76T and pfmdr1 86Y." Infect Genet Evol **6**(4): 309-314.
- Holmgren G., Hamrin J., Svard J., Martensson A., Gil J. P. and Bjorkman A. (2007). "Selection of *pfmdr1* mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa." Infect Genet Evol **7**(5): 562-569.
- Humphreys G. S., Merinopoulos I., Ahmed J., Whitty C. J., Mutabingwa T. K., Sutherland C. J. and Hallett R. L. (2007). "Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the Plasmodium falciparum mdr1 gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 991-997.
- Hung T. Y., Davis T. M., Ilett K. F., Karunajeewa H., Hewitt S., Denis M. B., Lim C. and Socheat D. (2004). "Population pharmacokinetics of piperaquine in adults and children with uncomplicated falciparum or vivax malaria." Br J Clin Pharmacol **57**(3): 253-262.
- I.E. A.-E., ElGhazali G., TM A. E., Hamad A. A., Babiker H. A., Elbashir M. I. and Giha H. A. (2007). "Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P. falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission." Parasitol Res **102**(1): 29-34.
- Kamya M. R., Yeka A., Bukirwa H., Lugeswa M., Rwakimari J. B., Staedke S. G., Talisuna A. O., Greenhouse B., Nosten F., Rosenthal P. J., Wabwire-Mangen F. and Dorsey G. (2007). "Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of malaria: a randomized trial." PLoS Clin Trials **2**(5): e20.

- Karema C., Fanello C. I., van Overmeir C., van Geertruyden J. P., van Doren W., Ngamije D. and D'Alessandro U. (2006). "Safety and efficacy of dihydroartemisinin/piperaquine (Artekin) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Rwandan children." Trans R Soc Trop Med Hyg **100**(12): 1105-1111.
- Kassim O. O., Ako-Anai K. A., Torimiro S. E., Hollowell G. P., Okoye V. C. and Martin S. K. (2000). "Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite." J Trop Pediatr **46**(2): 92-96.
- Kemp D. J. (1992). "Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*." Immunol Cell Biol **70** ( Pt 3): 201-207.
- Konate A. T., Yaro J. B., Ouedraogo A. Z., Diarra A., Gansane A., Soulama I., Kangoye D. T., Kabore Y., Ouedraogo E., Ouedraogo A., Tiono A. B., Ouedraogo I. N., Chandramohan D., Cousens S., Milligan P. J., Sirima S. B., Greenwood B. and Diallo D. A. (2011). "Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Burkina Faso: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." PLoS Med **8**(2): e1000408.
- Kublin J. G., Dzinjalama F. K., Kamwendo D. D., Malkin E. M., Cortese J. F., Martino L. M., Mukadam R. A., Rogerson S. J., Lescano A. G., Molyneux M. E., Winstanley P. A., Chimpeni P., Taylor T. E. and Plowe C. V. (2002). "Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria." J Infect Dis **185**(3): 380-388.
- Lindegardh N., Annerberg A., White N. J. and Day N. P. (2008). "Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperaquine in plasma stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **862**(1-2): 227-236.
- Maiteki-Sebuguzi C., Jagannathan P., Yau V. M., Clark T. D., Njama-Meya D., Nzarubara B., Talisuna A. O., Kanya M. R., Rosenthal P. J., Dorsey G. and Staedke S. G. (2008). "Safety and tolerability of combination antimalarial therapies for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children." Malar J **7**: 106.
- Makler M., Palmer C. J. and Ager A. (1998). "A review of practical techniques for the diagnosis of malaria." Ann Trop Med Parasitol **92**: 419-433.
- Martensson A., Stromberg J., Sisowath C., Msellem M. I., Gil J. P., Montgomery S. M., Oliaro P., Ali A. S. and Bjorkman A. (2005). "Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania." Clin Infect Dis **41**(8): 1079-1086.
- Mazier D. (1991). Cycle et biologie des plasmodies. Paris.
- Meyer C. G., May J., Arez A. P., Gil J. P. and Do Rosario V. (2002). "Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages." Trop Med Int Health **7**(5): 395-408.
- Minodier P., Noel G., Blanc P., Retornaz K. and Garnier J. M. (2005). "[Tests for rapid diagnosis of malaria]." Arch Pediatr **12**(6): 697-699.
- Mockenhaupt F. P., Ehrhardt S., Gellert S., Otchwemah R. N., Dietz E., Anemana S. D. and Bienzle U. (2004). "Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria." Blood **104**(7): 2003-2006.

- Modiano D., Sirima B. S., Sawadogo A., Sanou I., Pare J., Konate A. and Pagnoni F. (1999). "Severe malaria in Burkina Faso: urban and rural environment." Parassitologia **41**(1-3): 251-254.
- Muangnoicharoen S., Johnson D. J., Looareesuwan S., Krudsood S. and Ward S. A. (2009). "Role of known molecular markers of resistance in the antimalarial potency of piperazine and dihydroartemisinin in vitro." Antimicrob Agents Chemother **53**(4): 1362-1366.
- Nankabirwa J., Cundill B., Clarke S., Kabatereine N., Rosenthal P. J., Dorsey G., Brooker S. and Staedke S. G. (2010). "Efficacy, safety, and tolerability of three regimens for prevention of malaria: a randomized, placebo-controlled trial in Ugandan schoolchildren." PLoS One **5**(10): e13438.
- Newton C. R., Warn P. A., Winstanley P. A., Peshu N., Snow R. W., Pasvol G. and Marsh K. (1997). "Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya." Trop Med Int Health **2**(2): 165-178.
- Noedl H., Socheat D. and Satimai W. (2009). "Artemisinin-resistant malaria in Asia." N Engl J Med **361**(5): 540-541.
- Noedl H., Se Y., Schaefer K., Smith B. L., Socheat D. and Fukuda M. M. (2008). "Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia." N Engl J Med **359**(24): 2619-2620.
- Nsobya S. L., Dokomajilar C., Joloba M., Dorsey G. and Rosenthal P. J. (2007). "Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr1* alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 3023-3025.
- O'Meara W. P., Mwangi T. W., Williams T. N., McKenzie F. E., Snow R. W. and Marsh K. (2008). "Relationship between exposure, clinical malaria, and age in an area of changing transmission intensity." Am J Trop Med Hyg **79**(2): 185-191.
- Ochong E. O., van den Broek I. V., Keus K. and Nzila A. (2003). "Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan." Am J Trop Med Hyg **69**(2): 184-187.
- Ohashi J., Naka I., Patarapotikul J., Hananantachai H., Brittenham G., Looareesuwan S., Clark A. G. and Tokunaga K. (2004). "Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection." Am J Hum Genet **74**(6): 1198-1208.
- Oliver M., Simon F., de Monbrison F., Beavogui A. H., Pradines B., Ragot C., Moalic J. L., Rapp C. and Picot S. (2008). "[New use of primaquine for malaria]." Med Mal Infect **38**(4): 169-179.
- Olliaro P. and Mussano P. (2003). "Amodiaquine for treating malaria." Cochrane Database Syst Rev(2): CD000016.
- Pages F., Orlandi-Pradines E. and Corbel V. (2007). "[Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]." Med Mal Infect **37**(3): 153-161.
- Pathirana S. L., Alles H. K., Bandara S., Phone-Kyaw M., Perera M. K., Wickremasinghe A. R., Mendis K. N. and Handunnetti S. M. (2005). "ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria." Ann Trop Med Parasitol **99**(2): 119-124.
- Pearce R. J., Pota H., Evehe M. S., Ba el H., Mombo-Ngoma G., Malisa A. L., Ord R., Inojosa W., Matondo A., Diallo D. A., Mbacham W., van den Broek I. V., Swarthout T. D.,

- Getachew A., Dejene S., Grobusch M. P., Njie F., Dunyo S., Kweku M., Owusu-Agyei S., Chandramohan D., Bonnet M., Guthmann J. P., Clarke S., Barnes K. I., Streat E., Katokele S. T., Uusiku P., Agboghroma C. O., Elegba O. Y., Cisse B., IE A. E., Giha H. A., Kachur S. P., Lynch C., Rwakimari J. B., Chanda P., Hawela M., Sharp B., Naidoo I. and Roper C. (2009). "Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria." *PLoS Med* **6**(4): e1000055.
- Peel S. A. (2001). "The ABC transporter genes of *Plasmodium falciparum* and drug resistance." *Drug Resist Updat* **4**(1): 66-74.
- Plowe C. V. and Wellems T. E. (1995). "Molecular approaches to the spreading problem of drug resistant malaria." *Adv Exp Med Biol* **390**: 197-209.
- Pradines B., Vial H. and Olliaro P. (2003). "[Malaria prophylaxis and treatment: problems, recent developments and perspectives]." *Med Trop (Mars)* **63**(1): 79-98.
- Prudencio M., Rodriguez A. and Mota M. M. (2006). "The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage." *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 849-856.
- Rayner J. C. (2009). "The merozoite has landed: reticulocyte-binding-like ligands and the specificity of erythrocyte recognition." *Trends Parasitol* **25**(3): 104-106.
- Reed M. B., Saliba K. J., Caruana S. R., Kirk K. and Cowman A. F. (2000). "Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*." *Nature* **403**(6772): 906-909.
- Riley E. M., Wagner G. E., Akanmori B. D. and Koram K. A. (2001). "Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection?" *Parasite Immunol* **23**(2): 51-59.
- Roepe P. D. (2009). "Molecular and physiologic basis of quinoline drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria." *Future Microbiol* **4**(4): 441-455.
- Roper C., Pearce R., Nair S., Sharp B., Nosten F. and Anderson T. (2004). "Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria." *Science* **305**(5687): 1124.
- Rossi P., Belli A., Mancini L. and Sabatinelli G. (1986). "[A longitudinal entomologic survey on the transmission of malaria in Ouagadougou (Burkina Faso)]." *Parassitologia* **28**(1): 1-15.
- Rowe J. A., Claessens A., Corrigan R. A. and Arman M. (2009). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications." *Expert Rev Mol Med* **11**: e16.
- Rowe J. A., Handel I. G., Thera M. A., Deans A. M., Lyke K. E., Kone A., Diallo D. A., Raza A., Kai O., Marsh K., Plowe C. V., Doumbo O. K. and Moulds J. M. (2007). "Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(44): 17471-17476.
- Santé M. d. I. (2011a). Rapport de la revue du Programme National de lutte contre le Paludisme. Ouagadougou, Burkina Faso.
- Santé M. d. I. (2011b). Annuaire statistique de la sante 2010. D. G. d. I. I. e. d. S. Sanitaires. OUAGADOUGOU: 204.
- Sesay S., Milligan P., Touray E., Sowe M., Webb E. L., Greenwood B. M. and Bojang K. A. (2010). "A trial of intermittent preventive treatment and home-based management of malaria in a rural area of The Gambia." *Malar J* **10**: 2.
- Siau A., Silvie O., Franetich J. F., Yalaoui S., Marinach C., Hannoun L., van Gemert G. J., Luty A. J., Bischoff E., David P. H., Snounou G., Vaquero C., Froissard P. and Mazier D. (2008). "Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection." *PLoS Pathog* **4**(8): e1000121.



- Silvie O., Goetz K. and Matuschewski K. (2008). "A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of *Plasmodium* liver stage development." PLoS Pathog **4**(6): e1000086.
- Silvie O., Franetich J. F., Renia L. and Mazier D. (2004). "Malaria sporozoite: migrating for a living." Trends Mol Med **10**(3): 97-100; discussion 100-101.
- Sisowath C., Stromberg J., Martensson A., Msellem M., Obondo C., Bjorkman A. and Gil J. P. (2005). "In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfm<sub>dr</sub>1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem)." J Infect Dis **191**(6): 1014-1017.
- Snounou G. and Beck H. P. (1998). "The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment." Parasitol Today **14**(11): 462-467.
- Stepniewska K. and White N. J. (2008). "Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance." Antimicrob Agents Chemother **52**(5): 1589-1596.
- Sutherland C. J., Allouche A., Curtis J., Drakeley C. J., Ord R., Duraisingh M., Greenwood B. M., Pinder M., Warhurst D. and Targett G. A. (2002). "Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes." Am J Trop Med Hyg **67**(6): 578-585.
- Tamez P. A., Liu H., Fernandez-Pol S., Haldar K. and Wickrema A. (2009). "Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to *Plasmodium falciparum* malaria infection." Blood **114**(17): 3652-3655.
- Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P. and Krudsood S. (2009). "Malaria diagnosis: a brief review." Korean J Parasitol **47**(2): 93-102.
- Tardieux I. and Menard R. (2008). "Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides." Traffic **9**(5): 627-635.
- Tarning J., Ashley E. A., Lindegardh N., Stepniewska K., Phaiphun L., Day N. P., McGready R., Ashton M., Nosten F. and White N. J. (2008). "Population pharmacokinetics of piperazine after two different treatment regimens with dihydroartemisinin-piperazine in patients with *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand." Antimicrob Agents Chemother **52**(3): 1052-1061.
- Tinto H., Guekoun L., Zongo I., Guiguemde R. T., D'Alessandro U. and Ouedraogo J. B. (2008). "Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfcr*t T76 and *Pfmdr*-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso." Trop Med Int Health **13**(2): 238-240.
- Tinto H., Ouedraogo J. B., Zongo I., van Overmeir C., van Marck E., Guiguemde T. R. and D'Alessandro U. (2007). "Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women." Am J Trop Med Hyg **76**(4): 608-613.
- Tinto H., Ouedraogo J. B., Erhart A., Van Overmeir C., Dujardin J. C., Van Marck E., Guiguemde T. R. and D'Alessandro U. (2003). "Relationship between the *Pfcr*t T76 and the *Pfmdr*-1 Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa." Infect Genet Evol **3**(4): 287-292.
- Tinto H., Diallo S., Zongo I., Guiraud I., Valea I., Kazienga A., Kpoda H., Sorgho H., Ouedraogo J. B., Guiguemde T. R. and D'Alessandro U. (2014). "Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial." Trop Med Int Health.

- Triglia T., Wellem T. E. and Kemp D. J. (1992). "Towards a high-resolution map of the *Plasmodium falciparum* genome." Parasitol Today **8**(7): 225-229.
- Valderramos S. G. and Fidock D. A. (2006). "Transporters involved in resistance to antimalarial drugs." Trends Pharmacol Sci **27**(11): 594-601.
- Valderramos S. G., Scanfeld D., Uhlemann A. C., Fidock D. A. and Krishna S. (2010). "Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3842-3852.
- Verra F., Simporé J., Warimwe G. M., Tetteh K. K., Howard T., Osier F. H., Bancone G., Avellino P., Blot I., Fegan G., Bull P. C., Williams T. N., Conway D. J., Marsh K. and Modiano D. (2007). "Haemoglobin C and S role in acquired immunity against *Plasmodium falciparum* malaria." PLoS One **2**(10): e978.
- Viriyakosol S., Siripoon N., Petcharapirat C., Petcharapirat P., Jarra W., Thaithong S., Brown K. N. and Snounou G. (1995). "Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies." Bull World Health Organ **73**(1): 85-95.
- Vlachou D., Schlegelmilch T., Runn E., Mendes A. and Kafatos F. C. (2006). "The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes." Curr Opin Genet Dev **16**(4): 384-391.
- White N. (1999). "Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1384): 739-749.
- White N. J. (2008a). "Qinghaosu (artemisinin): the price of success." Science **320**(5874): 330-334.
- White N. J. (2008b). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite." Clin Infect Dis **46**(2): 172-173.
- White N. J. and Pongtavornpinyo W. (2003). "The de novo selection of drug-resistant malaria parasites." Proc Biol Sci **270**(1514): 545-554.
- WHO (2000a). "Severe falciparum malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg **94**: 1-90.
- WHO (2000b). The African Summit on Roll Back Malaria. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (2000c) "Severe *P. falciparum* malaria." Trans. of The Royal Society of Trop. **94**, 90p.
- WHO (2001). Antimalarial Drug Combination Therapy. Report of a WHO Technical Consultation, Geneva, Switzerland, WHO/CDS/RBM.
- WHO (2005). Susceptibility of *P. falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring 1996-2004. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (2006). Guidelines for treatment of malaria. Geneva, World Health Organisation.
- WHO (2011). Report of the technical consultation on Seasonal Malaria Chemoprevention(SMC). W. h. Organisation. Geneva.
- WHO (2013). World malaria report 2013.
- WHO Scientific Group on Chemotherapy of Malaria. and World Health Organization. (1967). Chemotherapy of malaria : report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 25 April to 1 May 1967]. World Health Organization technical report series. Geneva, World Health Organization: 91 p.
- Wongsrichanalai C. and Meshnick S. R. (2008). "Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border." Emerg Infect Dis **14**(5): 716-719.

- World Health Organization. (2008). World malaria report 2008. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization. (2010a). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva, World Health Organization.
- World Health Organization. (2010b). World malaria report: 2010. Geneva, World Health Organization.
- Yamauchi L. M., Coppi A., Snounou G. and Sinnis P. (2007). "*Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site." Cell Microbiol **9**(5): 1215-1222.
- Yeka A., Dorsey G., Kanya M. R., Talisuna A., Lugemwa M., Rwakimari J. B., Staedke S. G., Rosenthal P. J., Wabwire-Mangen F. and Bukirwa H. (2008). "Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda." PLoS One **3**(6): e2390.
- Yeung S., Pongtavornpinyo W., Hastings I. M., Mills A. J. and White N. J. (2004). "Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices." Am J Trop Med Hyg **71**(2 Suppl): 179-186.
- Zhang Q., Xue X., Xu X., Wang C., Chang W. and Pan W. (2009). "Influence of HLA-DRB1 alleles on antibody responses to PfCP-2.9-immunized and naturally infected individuals." J Clin Immunol **29**(4): 454-460.
- Zongo I., Dorsey G., Rouamba N., Dokomajilar C., Sere Y., Rosenthal P. J. and Ouedraogo J. B. (2007a). "Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso." Clin Infect Dis **45**(11): 1453-1461.
- Zongo I., Dorsey G., Rouamba N., Tinto H., Dokomajilar C., Guiguemde R. T., Rosenthal P. J. and Ouedraogo J. B. (2007b). "Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial." Lancet **369**(9560): 491-498.

## **ARTICLE NUMERO 1**

**TITRE** : Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May;54(5):1949-54

## Selection of Known *Plasmodium falciparum* Resistance-Mediating Polymorphisms by Artemether-Lumefantrine and Amodiaquine–Sulfadoxine-Pyrimethamine but Not Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso<sup>∇</sup>

Anyirékun Fabrice Somé,<sup>1</sup> Yves Y. Séré,<sup>1</sup> Christian Dokomajilar,<sup>2</sup> Issaka Zongo,<sup>1</sup> Noël Rouamba,<sup>1</sup> Bryan Greenhouse,<sup>2</sup> Jean-Bosco Ouédraogo,<sup>1</sup> and Philip J. Rosenthal<sup>2\*</sup>

*Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso,<sup>1</sup> and Department of Medicine, University of California, San Francisco, California<sup>2</sup>*

Received 6 October 2009/Returned for modification 7 February 2010/Accepted 2 March 2010

Artemether-lumefantrine (AL), dihydroartemisinin-piperaquine (DP), and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine (AQ-SP) offer excellent antimalarial efficacy but may select for parasite polymorphisms that decrease drug sensitivity. We evaluated the selection of known polymorphisms in genes encoding putative transporters (*pfert* and *pfmdr1*) and SP targets (*pfdhfr* and *pfthps*) in parasites that caused new infections within 42 days of therapy for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso. In 559 children in 2006, 42-day genotype-uncorrected failures were seen in 31.2% with AL, 11.8% with AQ-SP, and 7.6% with DP. After prior AL therapy, selection of wild-type sequences was seen for K76T in *pfert* (72.7% mixed or mutant results pretreatment versus 52.1% in new infections;  $P = 0.008$ ) and N86Y (36.0% versus 18.7%;  $P = 0.025$ ) and Y184F (66.7% versus 45.8%;  $P = 0.009$ ) in *pfmdr1*. After prior AQ-SP therapy, selection of mutant sequences was seen for N51I (30.8% versus 61.5%;  $P = 0.05$ ), C59R (28.2% versus 76.9%;  $P = 0.002$ ), and S108N (30.8% versus 76.9%;  $P = 0.005$ ) in *pfdhfr*. After prior DP therapy, selection was not seen for K76T (72.7% versus 77.8%;  $P = 0.96$ ) in *pfert* or N86Y (36.0% versus 33.3%;  $P = 0.84$ ), Y184F (66.7% versus 77.8%;  $P = 0.39$ ), or D1246Y (9.3% versus 0%;  $P = 0.42$ ) in *pfmdr1*. In 378 additional treatments with DP in 2007, 42-day uncorrected failure was seen in 10.9%. After prior DP, selection was again not seen for K76T (66.7% mixed or mutant results versus 59.5%;  $P = 0.43$ ) in *pfert* or N86Y (38.7% versus 40.5%;  $P = 0.85$ ), Y184F (67.6% versus 73.0%;  $P = 0.54$ ), or D1246Y (3.6% versus 8.1%;  $P = 0.50$ ) in *pfmdr1*. Despite its chemical similarity, piperaquine did not select for the same polymorphisms as chloroquine or AQ, suggesting different mechanisms of resistance.

Malaria, especially that caused by *Plasmodium falciparum*, is one of the most important infectious diseases in the world, and its control is hampered by increasing resistance of malaria parasites to available drugs (18). Recently, standard therapy for uncomplicated falciparum malaria has changed to artemisinin-based combination therapy (ACT) in nearly all countries in which this disease is endemic (47). ACTs all include a rapid-acting and potent artemisinin derivative combined with a longer-acting partner drug. Optimal ACTs offer excellent efficacy via destruction of most infecting parasites by the fast-acting artemisinin and elimination of any remaining parasites by the long-acting partner drug. However, the extended half-lives of the partner drugs may allow selection for drug-resistant parasites after treatment if new infections occur while these drugs are still circulating. In Africa, one of two ACTs, artemether-lumefantrine (AL) or artesunate-amodiaquine (AS-AQ), is now first-line therapy for uncomplicated falciparum malaria in nearly every country where malaria is endemic. Another ACT, dihydroartemisinin-piperaquine (DP), is a first-line therapy for falciparum malaria in Vietnam and has shown excellent efficacy in Asia (21, 39, 42) and Africa (26–27, 49–50). Pipera-

quine (PQ) has the longest terminal elimination half-life (~3 to 4 weeks) of the available artemisinin partner drugs (25, 33, 45). This feature leads to lower rates of new infection after treatment with DP than after other ACTs (21, 26, 49–50). However, the long half-life of PQ also suggests that DP may be at high risk for selection of PQ-resistant parasites, as the drug will circulate at low levels for many days after therapy, offering selection for relatively resistant parasites inoculated during subsequent mosquito bites. Indeed, PQ resistance became a major problem after PQ monotherapy was heavily used in China in the 1970s and 1980s, with multiple reports of *in vitro* and clinical drug resistance (3). Considering *in vitro* studies from Africa, parasites were generally quite sensitive to PQ; however, some parasites with 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of >100 nM were identified (1, 4, 32), and concern remains that heavy use of DP may select for PQ-resistant parasites that fail therapy with DP.

A number of mechanisms of resistance of malaria parasites to available drugs are now well characterized (19, 48). Resistance to chloroquine (CQ) is mediated principally by the 76T mutation in the putative drug transporter *pfert* (5, 14), and a number of mutations in a second putative transporter, *pfmdr1*, may contribute to the resistant phenotype. The same polymorphisms appear to lead to resistance to AQ, a related aminoquinoline; however, AQ often retains efficacy against CQ-resistant parasites, and it appears that *pfmdr1* mutations play a

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Medicine, Box 0811, University of California, San Francisco, CA 94143. Phone: (415) 206-8845. Fax: (415) 648-8425. E-mail: prosenthal@medsfgh.ucsf.edu.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 15 March 2010.

TABLE 1. Outcomes from clinical trials comparing combination therapies in Burkina Faso<sup>a</sup>

Therapy (yr of study)	No. of patients:		No. (%) of patients exhibiting:			
	Enrolled	With outcomes	Early treatment failure	Late clinical failure	Late parasitological failure	Adequate clinical and parasitological response
AQ/SP (2006)	184	169	5 (3.0)	6 (3.6)	9 (5.3)	149 (88.2)
AL (2006)	188	176	2 (1.1)	34 (19.3)	19 (10.8)	121 (68.8)
DP (2006)	187	172	2 (1.2)	8 (4.7)	3 (1.7)	159 (92.4)
DP (2007)	378	367	0	10 (2.7)	30 (8.2)	327 (89.1)

<sup>a</sup> Results are shown for a three-arm comparative trial conducted in 2006 (50) and a single-arm trial of DP conducted in 2007. Results represent genotype-uncorrected clinical outcomes.

more important role in resistance than with CQ (7, 20, 36). PQ is a bisquinoline related to CQ and AQ. As noted above, PQ resistance was noted in China some decades ago; however, molecular mediators of resistance were not reported, and mechanisms of resistance to PQ are unknown. For the antifolate sulfadoxine-pyrimethamine (SP), resistance-mediating polymorphisms are well described, with parasites in Africa commonly containing four to five mutations in the target enzymes dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthase (DHPS) (19).

A sensitive means of identifying early selection for parasites with decreased sensitivity to antimalarial drugs is to search for the selection of resistance-mediating polymorphisms in parasites that emerge soon after therapy, when ACT partner drugs are still circulating. Such studies in Africa showed that (i) CQ (5, 44), AQ (7, 20, 22–24), and AQ-containing combinations (6, 23, 34) selected for *pfprt* and *pfmdr1* mutations associated with resistance to CQ and AQ; (ii) AL selected for wild-type sequences at these same loci (8, 24, 29, 41, 51); and (iii) SP or SP-containing combinations selected for known resistance-mediating polymorphisms in *pfdhfr* and *pfdhps* (6, 7, 51). As DP is one of the most promising new antimalarials for Africa, but also might provide the greatest selective pressure for resistance, we studied selection by DP of polymorphisms known to mediate responses to other drugs in *P. falciparum* samples from two clinical trials in Burkina Faso. We found that, although PQ is closely related to CQ and AQ, it did not select for polymorphisms known to mediate diminished sensitivity to the other aminoquinolines.

#### MATERIALS AND METHODS

**Clinical trials.** Samples were from two clinical trials, both conducted at three government health dispensaries in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Results from the first clinical trial have been published, and the prior report includes a detailed description of the study methodology (50). In brief, individuals over 6 months of age with documented uncomplicated falciparum malaria were randomized to receive AL, AQ-SP, or DP and followed for 42 days, and outcomes were classified according to WHO guidelines. The second trial had an identical design, with treatment of patients aged over 6 months for uncomplicated malaria and rigorous 42-day follow-up, except that the trial included only a single study drug, DP, as it was designed to evaluate the pharmacokinetics of this drug. Both trials were registered (ISRCTN94367569 and ISRCTN59761234) and approved by institutional review boards of the Institut de Recherche en Sciences de la Santé/Centre Muraz, Burkina Faso, and the University of California, San Francisco.

**Laboratory studies.** Blood samples were collected on filter paper on the day of initial diagnosis and for episodes of recurrent parasitemia more than 6 days after the initiation of therapy. DNA was isolated with Chelex resin. For recurrences within 42 days, paired initial and recurrence samples were genotyped in a step-wise fashion by the use of *msp-2*, *msp-1*, and four microsatellites, as previously described (17). If, at any locus, there were no alleles in common between day-0

and the day-of-recurrence samples, the infection was classified as new. If at least one allele was in common at each of the six loci, the infection was classified as a recrudescence.

Relevant resistance-associated single-nucleotide polymorphisms were assessed. Polymorphisms studied were as follows: K76T in *pfprt*; N86Y, Y184F, and D1246Y in *pfmdr1*; and, for AQ-SP-treated patients, N51I, C59R, and S108N in *pfdhfr* and A437G and K540E in *pfdhps*. All mutations were identified using nested PCR, followed by restriction enzyme digestion, as previously described (10, 12, 13). Digestion products were resolved by gel electrophoresis, and results were classified as wild type or mutant, based on migration patterns. Mixed samples, containing both wild-type and mutant alleles, were classified as mutant. Investigators were blinded to treatment group and outcomes during the molecular analysis.

**Statistical analysis.** For our first trial, to evaluate differences in prevalences of polymorphisms prior to therapy and in new infections after therapy, we compared prevalences of each polymorphism of interest in 150 (for *pfprt* and *pfmdr1*) or 39 (for *pfdhfr* and *pfdhps*) randomly selected pretreatment samples with those in parasites that caused new infection within 42 days after a prior therapy. For our second trial, comparisons were made with 111 randomly selected pretreatment samples. All data were entered and verified using SPSS or EpiInfo 6.04 and analyzed using STATA version 8.0. Categorical variables were compared using the chi-squared or Fisher's exact test as appropriate. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

#### RESULTS

**Clinical trials providing parasites for study.** Two trials from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, provided the parasites evaluated in this study. A trial of 580 patients aged  $\geq 6$  months performed in 2006 compared the efficacies of AL, AQ-SP, and DP against uncomplicated falciparum malaria; results of this trial have already been published (50). The trial demonstrated 42-day genotype-uncorrected failures in 55/176 patients (31.2%) with AL, 20/169 (11.8%) with AQ-SP, and 13/172 (7.6%) with DP (Table 1). Clinical failures were primarily due to new infections after therapy. Recrudescences over 42 days after therapy were uncommon (<5% for all groups).

A second trial included 378 treatments for uncomplicated falciparum malaria in patients aged  $\geq 6$  months. In this trial, all subjects received DP to allow detailed assessment of drug pharmacokinetics. Patient outcomes were followed over 42 days in the same manner as in our first trial. Pharmacokinetic data will be published separately. This trial demonstrated 42-day genotype-uncorrected failures in 41/378 patients (10.9%) (Table 1). As in the prior trial, recrudescences over 42 days after therapy were uncommon (<1%).

**Selection of polymorphisms in parasites causing new infections in a randomized trial of AL, AQ-SP, or DP.** We evaluated polymorphisms in *pfprt* (K76T) and *pfmdr1* (N86Y, Y184F, D1246Y) associated with resistance to CQ and AQ and those in *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N) and *pfdhps* (A437G, K540E)

TABLE 2. Selection of polymorphisms in new infections after therapy with AL, AQ/SP, or DP

Gene	SNP <sup>c</sup>	Prevalence (%) in baseline samples <sup>a</sup>	Selection (%) in new infections after prior therapy with <sup>b</sup> :			Selection by <sup>d</sup> :		
			AL (n = 48)	AQ-SP (n = 13)	DP (n = 9)	AL	AQ-SP	DP
<i>pfcr</i>	K76T	72.7	52.1	76.9	77.8	WT (0.008)	No (0.99)	No (0.96)
<i>pfmdr1</i>	N86Y	36.0	18.7	61.5	33.3	WT (0.025)	No (0.13)	No (0.84)
	Y184F	66.7	45.8	69.2	77.8	WT (0.009)	No (0.91)	No (0.39)
	D1246Y	9.3	6.2	7.7	0	No (0.71)	No (0.76)	No (0.42)
<i>pfldhfr</i>	S108N	30.8		76.9			M (0.005)	
	N51I	30.8		61.5			M (0.05)	
	C59R	28.2		76.9			M (0.002)	
<i>pfldhps</i>	A437G	76.9		69.2			No (0.41)	
	K540E	0		0			No	

<sup>a</sup> n = 150 for *pfcr* and *pfmdr1*; n = 39 for *pfldhfr* and *pfldhps*.

<sup>b</sup> Proportions of infections classified as mixed or mutant at each allele are shown.

<sup>c</sup> SNP, single-nucleotide polymorphism.

<sup>d</sup> Values indicate whether statistically significant selection was toward the wild-type (WT) sequence or the mutant (M) sequence or whether there was no selection observed (No); for these assessments, P values are shown in parentheses.

associated with diminished responses to SP. We did not evaluate three additional mutations (S1034C and N1042D in *pfmdr1*; I164L in *pfldhfr*) or alterations in *pfmdr1* copy number that are important elsewhere but have never, to our knowledge, been seen in Burkina Faso. After prior AL therapy, new infections over 42 days were quite common, likely due to the relatively short half-life of lumefantrine compared to those of other artemisinin partner drugs. As has been reported previously, AL selected for wild-type sequences in *pfcr* and *pfmdr1* (Table 2). Polymorphisms in which there was statistically significant selection in new infections after prior therapy with AL, all with selection for the wild type, were K76 in *pfcr* and N86 and Y184 in *pfmdr1*. New infections were uncommon after treatment with AQ-SP or DP, limiting statistical power for identification of selection of polymorphisms in new infections. Polymorphisms in which there was selection for mutant sequences after treatment with AQ-SP were 51I, 59R, and 108N in *pfldhfr*, and there was also a nonsignificant trend toward selection of 86Y in *pfmdr1*. After prior DP, selection was not seen for the tested polymorphisms in *pfcr* and *pfmdr1*. However, since only nine new infections occurred within 42 days after treatment with DP, statistical power was limited for these analyses.

**Selection of polymorphisms in parasites causing new infections after therapy with DP.** Since few new infections were available for analysis in our first trial with DP, we analyzed a larger set of 378 treatments from a one-arm efficacy and pharmacokinetic study in Bobo-Dioulasso in 2007. This study confirmed the lack of selection for *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms seen in the prior trial. The prevalence of 76T in *pfcr* and 86Y, 184F, and 1246Y in *pfmdr1* was the same in baseline samples and in isolates causing new infections within 42 days after prior therapy with DP (Table 3).

## DISCUSSION

Our randomized trial allowed us to evaluate the selective pressures for known resistance-mediating polymorphisms of aminoquinoline and antifolate antimalarial therapies. We

found that, as expected based on prior studies, AL selected for wild-type sequences in *pfcr* and *pfmdr1* and AQ-SP selected for mutant sequences in *pfldhfr*. To our knowledge, the selective pressure of DP has not been studied previously. Surprisingly, PQ, which is closely related to CQ and AQ, did not select for the polymorphisms in *pfcr* or *pfmdr1* that mediate resistance to and are selected by CQ and AQ. Analysis of additional samples from a second trial of DP yielded similar results. Our results suggest that PQ does not have the same selective pressure, and possibly not the same mechanisms of resistance, as CQ and AQ.

In our two trials, recrudescences after treatment with DP were seen in only 5 of 550 evaluable episodes, and these few recrudescences may have been due to genotyping misclassification and host factors in addition to potential parasite resistance. Thus, there was limited opportunity to identify new mediators of DP resistance by analysis of recrudescence parasites. A more sensitive approach to identify selective pressure is to search for the impacts of treatments on infections that occur soon after prior therapies. In the case of DP, dihydroartemisinin has a half-life of about an hour (43), and so its impact on later infections is expected to be negligible. In con-

TABLE 3. Selection of polymorphisms in new infections after therapy with DP

Gene	SNP	Prevalence (%) in baseline samples (n = 111)	Selection (%) in new infections after prior DP therapy (%) <sup>a</sup>	Selection by DP <sup>b</sup>
<i>pfcr</i>	K76T	66.7	59.5	No (0.43)
<i>pfmdr1</i>	N86Y	38.7	40.5	No (0.85)
	Y184F	67.6	73.0	No (0.54)
	D1246Y	3.6	8.1	No (0.50)

<sup>a</sup> Proportions of infections classified as mixed or mutant at each allele are shown.

<sup>b</sup> "No" indicates that there was no selection observed; P values are shown in parentheses.

trast, the half-life of PQ is ~3 to 4 weeks (25, 33, 45). Thus, infections that emerge over 42 days after therapy necessarily are from parasites that became established despite persisting PQ drug levels, and these parasites can offer clues toward mediators of resistance.

Prior therapy with AQ-SP selected for new infections with the 86Y mutation in *pfmdr1*, but not for other known *pfcr* and *pfmdr1* mutations. This limited selection might be explained by small sample size, as few new infections were seen after therapy with AQ-SP. AQ-SP also selected for three common mutations in *pfdhfr*, but not another common mutation, 437G in *pfdhps*. These results are consistent with prior data suggesting that the key determinants of resistance to SP are, for *pfdhfr*, 59R, which was selected by AQ-SP, and, for *pfdhps*, 540E, which was not selected, presumably because it is rare in West Africa (9, 38). The absence of parasites with 540E in *pfdhps* in our study likely explains the excellent efficacy of AQ-SP in Burkina Faso (50). AL provided selective pressure in the opposite direction from that of AQ, with selection for wild-type sequences at K76 in *pfcr* and N86 and Y184 in *pfmdr1*, as has been reported previously (8, 24, 29, 41, 51). These wild-type alleles are associated with diminished sensitivity to halofantrine and mefloquine, which are related to lumefantrine (40, 46). Failures with AL have been uncommon, but it is likely that *pfcr* and *pfmdr1* wild-type parasites will be more likely than the mutant parasites commonly circulating in Africa to evade the effects of AL.

PQ monotherapy and chemoprophylaxis were heavily used in China beginning in the 1970s, and many reports subsequently noted unacceptable levels of *in vitro* and clinical resistance to PQ (3). Mechanisms of resistance to PQ are unknown. Subsequently, dihydroartemisinin and PQ were combined with other drugs and then developed as a two-drug ACT in the last decade. Recent studies have demonstrated outstanding efficacy against uncomplicated falciparum malaria for DP, with few recrudescences, and a strong posttreatment prophylactic effect, with significantly fewer new infections after therapy than with AS/AQ or AL (21, 26, 27, 49, 50). Thus, DP is one of our most promising ACTs for the control of falciparum malaria. However, the history of widespread resistance to PQ and the strong pressure for the selection of resistant parasites by this long-lasting drug remain a concern. Thus, it was important to explore selection by DP of parasites with potential mediators of resistance.

Our evaluation of over 500 samples from patients treated for falciparum malaria with DP in two trials in Burkina Faso showed that, in contrast to results with CQ and AQ, prior treatment with DP did not select for parasites with *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms associated with resistance to CQ and AQ. PQ was equally active against parasites sensitive and resistant to CQ in studies from Madagascar (4) and Cameroon (1), although some older studies from China reported cross-resistance between these drugs (3). A recent study of laboratory isolates showed that diminished responsiveness of parasites to PQ was associated with 76T in *pfcr*, but not with common *pfmdr1* polymorphisms, although the 11 isolates studied had a rather narrow range of sensitivity to PQ (30). A recent study of clinical isolates from Uganda showed correlation between sensitivities to CQ, monodesethylamodiaquine, and quinine, but not PQ (35). Taken together, available results

and our new findings suggest that DP does not select as readily as does AQ for known resistance-mediating polymorphisms. PQ may not readily select for these polymorphisms because resistance to PQ is not mediated by them. PQ (molecular weight [MW], 536) is larger than AQ (MW, 465) and CQ (MW, 320), and so it may be unable to utilize the same transporters as the other aminoquinolines to reach its site of action. Alternatively, as the mechanism of action of PQ is unknown, it is possible that the drug acts in a different location than do CQ and AQ and so is unaffected by alterations in *pfcr* and *pfmdr1*, both of which appear to encode transporters in the food vacuole membrane.

Our results have important implications for the use of new drug regimens to control malaria. At present, AL and AS-AQ are the recommended first-line therapies for uncomplicated falciparum malaria in nearly all countries in Africa. AL offers excellent efficacy, but in high-transmission areas, the relatively short half-life of lumefantrine leads to a high incidence of new infections soon after therapy (26, 49). AS-AQ has shown a significantly lower efficacy than has AL in East Africa (11, 31), presumably due to high prevalence of AQ-resistant parasites in this region. In addition, AQ toxicity has been a concern for many years, and recent reports of frequent neutropenia in HIV-infected (15) or uninfected (2) patients, recurrent neutropenia in children treated repeatedly with AQ-SP (28), and neutropenia and transaminitis in AQ-treated normal volunteers (16, 37) are of concern. DP offers a well-tolerated ACT with excellent efficacy and a long posttreatment prophylactic effect. However, the long terminal elimination half-life of PQ may allow for frequent selection of resistant parasites when new infections occur after dihydroartemisinin has been eliminated but low levels of PQ persist in the bloodstream. The relationship between pharmacokinetics, other factors, and resistance selection is complex (43), and it is unclear if or when PQ resistance may impact upon its antimalarial efficacy in Africa. For the long term, consideration may be given to adding an additional long-acting drug to DP to protect against selection of resistance to PQ. At present, our new results indicate that DP does not readily select for the polymorphisms that play a major role in resistance to CQ and AQ. Thus, DP may continue to show excellent efficacy in the face of increasing resistance to other aminoquinolines, but the mechanism of PQ resistance remains unknown, and we currently are without molecular markers to identify parasites with diminished sensitivity. Thus, surveillance for resistance by *in vitro* assessments of parasite sensitivity to PQ and research to identify mechanisms of PQ resistance are of high priority.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the study participants from our two clinical trials, their parents and guardians, and our study staff.

This research was supported in part by grants from the Fogarty International Center and National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health; the International Atomic Energy Agency; Beijing Holley-Cotec Pharmaceuticals; and the Doris Duke Charitable Foundation, for which P.J.R. is a Distinguished Clinical Scientist.

#### REFERENCES

- Basco, L. K., and P. Ringwald. 2003. *In vitro* activities of piperazine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1391–1394.



2. Bell, D. J., S. K. Nyirongo, M. Mukaka, E. E. Zijlstra, C. V. Plowe, M. E. Molyneux, S. A. Ward, and P. A. Winstanley. 2008. Sulfadoxine-pyrimethamine-based combinations for malaria: a randomised blinded trial to compare efficacy, safety and selection of resistance in Malawi. *PLoS One* 3:e1578.
3. Davis, T. M., T. Y. Hung, I. K. Sim, H. A. Karunajeweja, and K. F. Ilett. 2005. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs* 65:75–87.
4. Deloron, P., J. Le Bras, J. A. Ramanamirija, and P. Coulanges. 1985. Plasmodium falciparum in Madagascar: in vivo and in vitro sensitivity to seven drugs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79:357–365.
5. Djimdé, A., O. K. Doumbo, J. F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, A. Dicko, X. Z. Su, T. Nomura, D. A. Fidock, T. E. Wellem, C. V. Plowe, and D. Coulibaly. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* 344:257–263.
6. Djimdé, A. A., B. Fofana, I. Sagara, B. Sidibe, S. Toure, D. Dembele, S. Dama, D. Oulougou, A. Dicko, and O. K. Doumbo. 2008. Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:455–461.
7. Dokomajilar, C., Z. M. Lankoande, G. Dorsey, I. Zongo, J. B. Ouedraogo, and P. J. Rosenthal. 2006. Roles of specific Plasmodium falciparum mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:162–165.
8. Dokomajilar, C., S. L. Nsohya, B. Greenhouse, P. J. Rosenthal, and G. Dorsey. 2006. Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1893–1895.
9. Dorsey, G., C. Dokomajilar, M. Kiggundu, S. G. Staedke, M. R. Kanya, and P. J. Rosenthal. 2004. Principal role of dihydropteroate synthase mutations in mediating resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in single-drug and combination therapy of uncomplicated malaria in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:758–763.
10. Dorsey, G., M. R. Kanya, A. Singh, and P. J. Rosenthal. 2001. Polymorphisms in the Plasmodium falciparum pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J. Infect. Dis.* 183:1417–1420.
11. Dorsey, G., S. Staedke, T. D. Clark, D. Njama-Meya, B. Nzarubara, C. Maiteki-Sebuguzi, C. Dokomajilar, M. R. Kanya, and P. J. Rosenthal. 2007. Combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: a randomized trial. *JAMA* 297:2210–2219.
12. Duraisingh, M. T., J. Curtis, and D. C. Warhurst. 1998. Plasmodium falciparum: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp. Parasitol.* 89:1–8.
13. Duraisingh, M. T., P. Jones, I. Sambou, L. von Seidlein, M. Pinder, and D. C. Warhurst. 2000. The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:13–23.
14. Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekoun, M. T. Ferdig, L. M. Urso, A. B. Sidhu, B. Naude, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe, and T. E. Wellem. 2000. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell* 6:861–871.
15. Gasasira, A. F., M. R. Kanya, J. Achan, T. Mebrahtu, J. N. Kalyango, T. Ruel, E. Charlebois, S. G. Staedke, A. Kekitiinwa, P. J. Rosenthal, D. Havlir, and G. Dorsey. 2008. High risk of neutropenia in HIV-infected children following treatment with artesunate plus amodiaquine for uncomplicated malaria in Uganda. *Clin. Infect. Dis.* 46:985–991.
16. German, P., B. Greenhouse, C. Coates, G. Dorsey, P. J. Rosenthal, E. Charlebois, N. Lindégard, D. Havlir, and F. T. Aweeka. 2007. Hepatotoxicity due to a drug interaction between amodiaquine plus artesunate and efavirenz. *Clin. Infect. Dis.* 44:889–891.
17. Greenhouse, B., A. Myrick, C. Dokomajilar, J. M. Woo, E. J. Carlson, P. J. Rosenthal, and G. Dorsey. 2006. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal Plasmodium falciparum infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:836–842.
18. Greenwood, B. M., K. Bojang, C. J. Whitty, and T. A. Targett. 2005. Malaria. *Lancet* 365:1487–1498.
19. Gregson, A., and C. V. Plowe. 2005. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57:117–145.
20. Happi, C. T., G. O. Gbotosho, O. A. Folarin, O. M. Bolaji, A. Sowunmi, D. E. Kyle, W. Milhous, D. F. Wirth, and A. M. Oduola. 2006. Association between mutations in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and P. falciparum multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in P. falciparum malaria-infected children in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:155–161.
21. Hasugian, A. R., H. L. Purba, E. Kenangalem, R. M. Wuwung, E. P. Ebsworth, R. Maristela, P. M. Penttinen, F. Laihadi, N. M. Anstey, E. Tjitra, and R. N. Price. 2007. Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria. *Clin. Infect. Dis.* 44:1067–1074.
22. Holmgren, G., J. P. Gil, P. M. Ferreira, M. I. Veiga, C. O. Obonyo, and A. Bjorkman. 2006. Amodiaquine resistant Plasmodium falciparum malaria in vivo is associated with selection of pfcrt 76T and pfmdr1 86Y. *Infect. Genet. Evol.* 6:309–314.
23. Holmgren, G., J. Hamrin, J. Svard, A. Martensson, J. P. Gil, and A. Bjorkman. 2007. Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infect. Genet. Evol.* 7:562–569.
24. Humphreys, G. S., I. Merinopoulos, J. Ahmed, C. J. Whitty, T. K. Mutabingwa, C. J. Sutherland, and R. L. Hallett. 2007. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the Plasmodium falciparum mdr1 gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:991–997.
25. Hung, T. Y., T. M. Davis, K. F. Ilett, H. Karunajeweja, S. Hewitt, M. B. Denis, C. Lim, and D. Socheat. 2004. Population pharmacokinetics of piperaquine in adults and children with uncomplicated falciparum or vivax malaria. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57:253–262.
26. Kanya, M. R., A. Yeka, H. Bukirwa, M. Lugenwa, J. B. Rwakimari, S. G. Staedke, A. O. Talisuna, B. Greenhouse, F. Nosten, P. J. Rosenthal, F. Wabwire-Mangen, and G. Dorsey. 2007. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of malaria: a randomized trial. *PLoS Clin. Trials* 2:e20.
27. Karema, C., C. I. Fanello, C. van Overmeir, J. P. van Geertruyden, W. van Doren, D. Ngamije, and U. D'Alessandro. 2006. Safety and efficacy of dihydroartemisinin/piperaquine (Artekin) for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Rwandan children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:1105–1111.
28. Maiteki-Sebuguzi, C., P. Jagannathan, V. M. Yau, T. D. Clark, D. Njama-Meya, B. Nzarubara, A. O. Talisuna, M. R. Kanya, P. J. Rosenthal, G. Dorsey, and S. G. Staedke. 2008. Safety and tolerability of combination antimalarial therapies for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children. *Malar. J.* 7:106.
29. Mårtensson, A., J. Stromberg, C. Sisowath, M. I. Msellem, J. P. Gil, S. M. Montgomery, P. Olliaro, A. S. Ali, and A. Bjorkman. 2005. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood Plasmodium falciparum malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin. Infect. Dis.* 41:1079–1086.
30. Muangnoichareon, S., D. J. Johnson, S. Loareesuwan, S. Krudsood, and S. A. Ward. 2009. Role of known molecular markers of resistance in the antimalarial potency of piperaquine and dihydroartemisinin in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1362–1366.
31. Mutabingwa, T. K., D. Anthony, A. Heller, R. Hallett, J. Ahmed, C. Drakeley, B. M. Greenwood, and C. J. Whitty. 2005. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet* 365:1474–1480.
32. Mwai, L., S. M. Kiara, A. Abdurahman, L. Pole, A. Rippert, A. Diriye, P. Bull, K. Marsh, S. Borrmann, and A. Nzila. 2009. In vitro activity of piperaquine, lumefantrine and dihydroartemisinin in Kenyan Plasmodium falciparum isolates and polymorphisms in Pfcrt and Pfmdr1. *Antimicrob. Agents Chemother.*
33. Nguyen, T. C., N. Q. Nguyen, X. T. Nguyen, D. Bui, T. Travers, and M. D. Edstein. 2008. Pharmacokinetics of the antimalarial drug piperaquine in healthy Vietnamese subjects. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79:620–623.
34. Nsohya, S. L., C. Dokomajilar, M. Joloba, G. Dorsey, and P. J. Rosenthal. 2007. Resistance-mediated Plasmodium falciparum pfcrt and pfmdr1 alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3023–3025.
35. Nsohya, S. L., M. Kiggundu, S. Nanyunja, M. Joloba, B. Greenhouse, and P. J. Rosenthal. 2010. In vitro sensitivities of Plasmodium falciparum to different antimalarial drugs in Uganda. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1200–1206.
36. Ochong, E. O., I. V. van den Broek, K. Keus, and A. Nzila. 2003. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the Plasmodium falciparum multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:184–187.
37. Orrell, C., F. Little, P. Smith, P. Folb, W. Taylor, P. Olliaro, and K. I. Barnes. 2008. Pharmacokinetics and tolerability of artesunate and amodiaquine alone and in combination in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64:683–690.
38. Pearce, R. J., H. Pota, M. S. Evehe, E.-H. Ba, G. Mombongoma, A. L. Malisa, R. Ord, W. Inojosa, A. Matondo, D. A. Diallo, W. Mbacham, I. V. van den Broek, T. D. Swarthout, A. Getachew, S. Dejene, M. P. Grobusch, F. Nje, S. Dunyo, M. Kweku, S. Owusu-Agyei, D. Chandramohan, M. Bonnet, J. P. Guthmann, S. Clarke, K. I. Barnes, E. Streat, S. T. Katokele, P. Uusiku, C. O. Agboghroma, O. Y. Elegba, B. Cisse, I. E. A-Elbasit, H. A. Giha, S. P. Kachur, C. Lynch, J. B. Rwakimari, P. Chanda, M. Hawela, B. Sharp, I. Naidoo, and C. Roper. 2009. Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Med.* 6:e1000055.
39. Ratcliff, A., H. Siswantoro, E. Kenangalem, R. Maristela, R. M. Wuwung, F. Laihadi, E. P. Ebsworth, N. M. Anstey, E. Tjitra, and R. N. Price. 2007. Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant falciparum and vivax

- malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison. *Lancet* **369**:757–765.
40. Reed, M. B., K. J. Saliba, S. R. Caruana, K. Kirk, and A. F. Cowman. 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **403**:906–909.
  41. Sisowath, C., J. Stromberg, A. Martensson, M. Msellem, C. Obondo, A. Bjorkman, and J. P. Gil. 2005. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfmDr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J. Infect. Dis.* **191**:1014–1017.
  42. Smithuis, F., M. K. Kyaw, O. Phe, K. Z. Aye, L. Htet, M. Barends, N. Lindegardh, T. Singtoroj, E. Ashley, S. Lwin, K. Stepniewska, and N. J. White. 2006. Efficacy and effectiveness of dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-mefloquine in falciparum malaria: an open-label randomised comparison. *Lancet* **367**:2075–2085.
  43. Stepniewska, K., and N. J. White. 2008. Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1589–1596.
  44. Sutherland, C. J., A. Allouche, J. Curtis, C. J. Drakeley, R. Ord, M. Duraisingh, B. M. Greenwood, M. Pinder, D. Warhurst, and G. A. Targett. 2002. Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**:578–585.
  45. Tarning, J., E. A. Ashley, N. Lindegardh, K. Stepniewska, L. Phaiphun, N. P. Day, R. McGready, M. Ashton, F. Nosten, and N. J. White. 2008. Population pharmacokinetics of piperazine after two different treatment regimens with dihydroartemisinin-piperazine in patients with *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1052–1061.
  46. Valderramos, S. G., and D. A. Fidock. 2006. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**:594–601.
  47. White, N. J. 2008. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* **320**:330–334.
  48. Woodrow, C. J., and S. Krishna. 2006. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:1586–1596.
  49. Yeka, A., G. Dorsey, M. R. Kanya, A. Talisuna, M. Lugenwa, J. B. Rwakimari, S. G. Staedke, P. J. Rosenthal, F. Wabwire-Mangen, and H. Bukirwa. 2008. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS One* **3**:e2390.
  50. Zongo, I., G. Dorsey, N. Rouamba, C. Dokomajilar, Y. Sere, P. J. Rosenthal, and J. B. Ouedraogo. 2007. Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperazine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis.* **45**:1453–1461.
  51. Zongo, I., G. Dorsey, N. Rouamba, H. Tinto, C. Dokomajilar, R. T. Guiguemde, P. J. Rosenthal, and J. B. Ouedraogo. 2007. Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **369**:491–498.

## **ARTICLE NUMERO 2**

**TITRE :** Selection of Drug Resistance-Mediating *Plasmodium falciparum* Genetic Polymorphisms by Seasonal Malaria Chemoprevention in Burkina Faso. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul;58(7):3660-5.



## Selection of Drug Resistance-Mediating *Plasmodium falciparum* Genetic Polymorphisms by Seasonal Malaria Chemoprevention in Burkina Faso

AQ: au Anyirékun Fabrice Somé,<sup>a</sup> Issaka Zongo,<sup>a</sup> Yves-Daniel Compaoré,<sup>a</sup> Souleymane Sakandé,<sup>b</sup> François Nosten,<sup>c,d</sup> Jean-Bosco Ouédraogo,<sup>a,b</sup> Philip J. Rosenthal<sup>e</sup>

AQ: aff Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso<sup>a</sup>; Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso<sup>b</sup>; Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sod, Thailand<sup>c</sup>; Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom<sup>d</sup>; Department of Medicine, University of California, San Francisco, California, USA<sup>e</sup>

Seasonal malaria chemoprevention (SMC), with regular use of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine (AQ/SP) during the transmission season, is now a standard malaria control measure in the Sahel subregion of Africa. Another strategy under study is SMC with dihydroartemisinin plus piperaquine (DP). *Plasmodium falciparum* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *P. falciparum crt* (*pfcr*t), *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* are associated with decreased response to aminoquinoline and antifolate antimalarials and are selected by use of these drugs. To characterize selection by SMC of key polymorphisms, we assessed 13 SNPs in *P. falciparum* isolated from children aged 3 to 59 months living in southwestern Burkina Faso and randomized to receive monthly DP or AQ/SP for 3 months in 2009. We compared SNP prevalence before the onset of SMC and 1 month after the third treatment in *P. falciparum* PCR-positive samples from 120 randomly selected children from each treatment arm and an additional 120 randomly selected children from a control group that did not receive SMC. The prevalence of relevant mutations was increased after SMC with AQ/SP. Significant selection was seen for *pfcr*t 76T (68.5% to 83.0%,  $P = 0.04$ ), *pfdhfr* 59R (54.8% to 83.3%,  $P = 0.0002$ ), and *pfdhfr* 108N (55.0% to 87.2%,  $P = 0.0001$ ), with trends toward selection of *pfmdr1* 86Y, *pfdhfr* 51I, and *pfdhps* 437G. After SMC with DP, only borderline selection of wild-type *pfmdr1* D1246 (mutant; 7.7% to 0%,  $P = 0.05$ ) was seen. In contrast to AQ/SP, SMC with DP did not clearly select for known resistance-mediating polymorphisms. SMC with AQ/SP, but not DP, may hasten the development of resistance to components of this regimen. (This study has been registered at ClinicalTrials.gov under registration no. NCT00941785.)

Malaria remains one of the greatest causes of morbidity and mortality in African children (1). In many African countries, malaria transmission is markedly seasonal, with most of the disease burden occurring during a distinct rainy season. Among available malaria control methods, intermittent preventive therapy in children (IPTc) has been widely studied (2, 3), and a variant of this approach, seasonal malaria chemoprevention (SMC), with full-treatment regimens of amodiaquine (AQ [Camoquin; Parke-Davis]) plus sulfadoxine-pyrimethamine (SP [Fansidar; Roche]) (AQ/SP) provided monthly to at-risk children during the transmission season, has shown excellent protective efficacy in West Africa (4–6). Based on these results, SMC was recently endorsed by the WHO for use in at-risk children 3 to 59 months of age in areas of seasonal malaria transmission across the Sahel subregion of Africa (7). However, SMC is not recommended elsewhere, even for areas with seasonal transmission, due to known high levels of resistance to AQ and SP in eastern and southern Africa. For these areas, there is currently no standard recommendation for IPTc or SMC.

One alternative for SMC is dihydroartemisinin (Duocotexin; Holley Cotec)-piperaquine (DP), an artemisinin-based combination therapy that has demonstrated excellent efficacy in the treatment of uncomplicated malaria in Asia (8, 9) and Africa (10, 11) and, for chemoprevention, benefits from the long half-life of piperaquine. When administered monthly, DP offered a protective efficacy of 98% against malaria in Thai adults (12). In Senegalese children, the incidences of malaria were the same with monthly DP and monthly AQ/SP, although protective efficacies could not

be measured due to the lack of a control group (13). In Uganda, monthly DP administered without directly observed therapy to children 6 to 24 months of age had a protective efficacy against malaria of 58%, significantly greater than that of monthly SP or daily trimethoprim-sulfamethoxazole (14), and monthly DP administered to school children 6 to 14 years of age for 1 year had a protective efficacy of 96% (15). In Burkina Faso, intermittent preventive therapy with DP in children aged 3 to 59 months showed 77% protective efficacy compared to 83% for AQ/SP (I. Zongo, unpublished data). DP is thus of promise as an alternative to AQ/SP for SMC, especially if resistance to AQ or SP worsens in West Africa, and, more broadly, as an efficacious regimen for IPTc across Africa.

A concern with all malaria therapy, and in particular with chemoprevention, is the selection by therapy of parasites with decreased drug sensitivity. In the case of AQ/SP, mediators of drug resistance are well characterized. For AQ, resistance is mediated principally by the 76T mutation in *Plasmodium falciparum crt* (*pfcr*t) (16–18), which encodes a putative drug transporter, and is

Received 28 January 2014 Returned for modification 7 March 2014  
Accepted 11 April 2014

Published ahead of print 14 April 2014

Address correspondence to Philip J. Rosenthal, prosenthal@medsfg.ucsf.edu.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02406-14

augmented by polymorphisms in a second predicted transporter gene, *pfmdr1*. The *pfmdr1* 86Y and 1246Y mutations are common in Africa and mediate decreased sensitivity to AQ (16, 19–21); the Y184F allele is also highly polymorphic but is of uncertain significance. Additional *pfmdr1* polymorphisms at positions 1034 and 1042 and amplification of the gene are common in other areas but rare in Africa. For SP, mutations in *pfdhfr* and *pfdhps*, the genes encoding the drug targets, mediate resistance to both components of the drug, with increasing numbers of mutations leading to increasing resistance (22–24). In much of Africa, a set of 5 mutations is common, leading to marked limitations on SP efficacy, but in parts of West Africa, one of these mutations, *pfdhps* 540E, is rare, and SP efficacy remains good (25, 26).

Considering this background, it is of concern that increasing use of AQ/SP for SMC will jeopardize the efficacy of this regimen. In contrast to resistance to AQ/SP, resistance to DP does not appear to be a problem in Africa, despite the fact that heavy piperazine use in China some decades ago apparently led to widespread resistance (27). Further, unlike other antimalarials, including AQ/SP, DP has not selected for known resistance-mediating polymorphisms in recurrent infections soon after prior therapy in West Africa. Specifically, in infections occurring within 28 to 42 days of prior therapy in Burkina Faso, AQ/SP selected for mutations in *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcr1*, and *pfmdr1* associated with drug resistance, but DP did not select for any of these polymorphisms (20, 26, 28). However, in a recent study in East Africa, prior use of DP selected in recurrent infections for polymorphisms in *pfmdr1* that were also selected for by AQ/SP (29); the reasons for differences in selection between East and West Africa are unknown. To evaluate the relative selective pressures of AQ/SP and DP administered as SMC, we evaluated the prevalences of key resistance-mediating *P. falciparum* polymorphisms in parasites collected before the initiation of the intervention, from children a month after the completion of 3 monthly treatments, and from a control group of children not subject to the intervention.

## METHODS

**Study sites.** We conducted this study in three rural health centers (Satiri, Balla, and Kadomba), all located within ~10 km of each other in the district of Lena, 40 to 50 km north of Bobo-Dioulasso, the major city in southwestern Burkina Faso. Malaria transmission is holoendemic in the region, with a sharp peak in transmission during the rainy season (May to October) and with the peak malaria incidence from August to October.

**Study design and participants.** The clinical trial that provided samples for this analysis is to be described separately. Briefly, 1,500 children aged 3 to 59 months whose parents or guardians provided informed consent were randomized 1:1 to receive either monthly DP (dihydroartemisinin at 2.1 mg/kg of body weight and piperazine phosphate at 17 mg/kg administered once daily for 3 days) or monthly AQ (Camoquin; Parke-Davis) (10 mg/kg syrup administered once daily for 3 days) plus SP (Fansidar; Roche) (25 mg/kg sulfadoxine and 1.25 mg/kg pyrimethamine administered as one dose) (AQ/SP) in August, September, and October 2009. All drug administrations were directly observed. Children and guardians were encouraged to return to the clinic at the onset of any illness and were followed through November 2009. Children who presented with fever or a recent history of fever received a malaria rapid diagnostic test, and children with positive tests were treated with artemether-lumefantrine (Coartem) according to national guidelines. To estimate the incidence of malaria and prevalence of polymorphisms of interest in children not receiving SMC, a separate control cohort of 250 children from the study area was enrolled and followed in the same manner from September to November 2009.

The study was registered (ClinicalTrials.gov no. NCT00941785) and approved by Institutional Review Boards of the London School of Hygiene and Tropical Medicine and Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

**Samples for study.** Blood samples from finger sticks at enrollment and from a cross-sectional survey of participants in November, 1 month after the last dose of SMC, were placed on filter paper (Whatman 3MM), labeled with study numbers and dates, air-dried, and stored in sealed sample bags at ambient temperature with desiccant. We randomly selected for PCR 120 paired samples from each SMC group and 120 paired samples from the control group, with each paired set representing the enrollment and final survey samples for a single participant. PCR-positive samples from participants who experienced clinical malaria during the study were removed from the analysis because of their treatment with other antimalarial drugs during the study period.

**Laboratory methods.** DNA was isolated from selected dried blood spots with Chelex, as previously described (30). Known *P. falciparum* polymorphisms were assessed at the following alleles: *pfcr1* K76T; *pfmdr1* N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, and D1246Y; *pfdhfr* N511, C59R, S108N, and I164L; and *pfdhps* S436A, A437G, and K540E. Sequences were evaluated using nested PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, as described elsewhere (31–33). Digestion products were resolved by 2.5% gel electrophoresis, and results were classified as wild type, mixed (presence of both alleles), or mutant, based on migration patterns. Investigations were performed in a blind manner with respect to treatment group and clinical outcomes during the molecular analysis.

**Data analysis.** We compared the differences in the prevalences of the polymorphisms of interest between the baseline samples and those collected at the end of study, excluding samples from those who developed clinical malaria during follow-up to avoid the influence of therapy with artemether-lumefantrine and also excluding pairs for which at least one sample was negative for *P. falciparum* by PCR. Data were entered using Microsoft Access, managed with SPSS 18, and analyzed using Stata SE 11.0. Categorical variables were compared using the chi-square test.  $P < 0.05$  was considered to represent statistical significance.

## RESULTS

Among the samples from the 1,500 children included in the clinical trial, we randomly selected 120 paired samples from each SMC group and 120 paired samples from the control group, with each paired set representing the enrollment and final survey samples for a single participant (Fig. 1). From 120 randomly selected samples in the AQ/SP group, 77 (64.2%) had positive PCR for *P. falciparum* at both enrollment and the final survey; 48 (62.3%) of these PCR-positive participants did not develop malaria during the study and therefore received three rounds of SMC with AQ/SP. From 120 randomly selected samples in the DP group, 71 (59.2%) had positive PCR at both enrollment and follow-up; 46 (64.8%) of these PCR-positive participants did not develop malaria and therefore received three rounds of SMC with DP. Relevant SNPs in *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, and *pfdhps* were assessed. At enrollment, samples showed a high prevalence of mutations known to be associated with resistance to CQ and AQ (for *pfcr1*, 76T; for *pfmdr1*, 86Y) and to SP (for *pfdhfr*, 511, 59R, and 108N; for *pfdhps*, 437G) (Table 1). Consistent with most other available data, the *pfmdr1* 1246Y mutation was much less prevalent than in other parts of Africa, and we did not identify mutations at position 1034 or 1042 in *pfmdr1*, 164 in *pfdhfr*, or 540 in *pfdhps*.

Our primary interest was to compare the prevalences of key SNPs between the time of enrollment and the end of the study in the AQ/SP, DP, and control groups (Table 1). Prevalences of the SNPs of interest did not differ significantly between the three

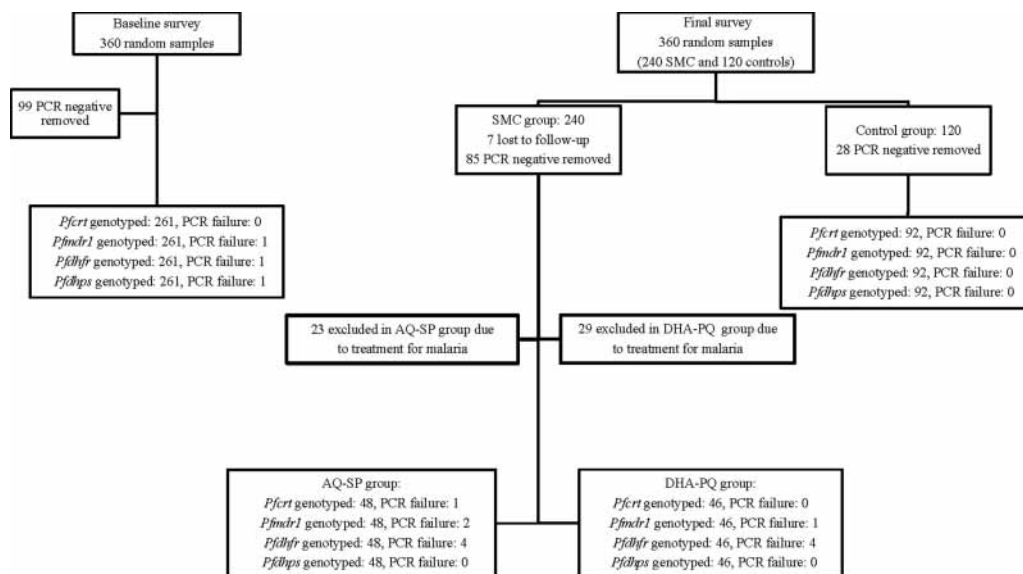


FIG 1 PCR genotyping profile.

study arms before the intervention (not shown). In the AQ/SP group, significant selection over the course of the trial was seen for *pfcrt* 76T (68.5% to 83.0%,  $P = 0.04$ ), *pfdhfr* 59R (54.8% to 83.3%,  $P = 0.0002$ ), and *pfdhfr* 108N (55.0% to 87.2%,  $P = 0.0001$ ), with trends toward selection of *pfmdr1* 86Y, *pfdhfr* N51I, and *pfdhps* 437G. In the DP group, no significant selection of alleles was seen, except for borderline selection of wild-type *pfmdr1* D1246 (mutant, 7.7% to 0%,  $P = 0.05$ ). For the control group, differences in

prevalence between enrollment samples and those collected at the end of the study were not seen for any alleles.

#### DISCUSSION

SMC is a promising strategy for malaria control in West Africa, and the use of monthly AQ/SP in at-risk children during the malaria transmission season is now endorsed by the WHO for the Sahel subregion of Africa. In the trial that provided samples for

TABLE 1 Selection of *P. falciparum* polymorphisms by SMC regimens<sup>a</sup>

Gene	SNP	Prevalence of mutation (%) in baseline samples ( $n = 261$ )	Prevalence of mutation (%) at the end of the study			$P$ value for selection of mutant (M) or wild type (WT)		
			AQ/SP ( $n = 48$ )	DP ( $n = 46$ )	No SMC ( $n = 92$ )	AQ/SP	DP	No SMC
<i>pfcrt</i>	K76T	68.5	83.0	65.2	62.0	<b>0.04 (M)</b>	0.66	0.25
<i>pfmdr1</i>	N86Y	29.1	37.5	32.6	33.0	0.24 (M)	0.62	0.52
	Y184F	58.5	58.3	56.5	67.0	0.98	0.79 (WT)	0.13 (M)
	S1034C	0	0	0	0	1	1	1
	N1042D	0	0	0	0	1	1	1
	D1246Y	7.7	4.2	0	8.0	0.5	<b>0.05 (WT)</b>	0.97
<i>pfdhfr</i>	N51I	58.1	69.6	54.6	59.0	0.14 (M)	0.66	0.91
	C59R	54.8	83.3	45.7	48.0	<b>0.0002 (M)</b>	0.25	0.25
	S108N	55.0	87.2	51.1	53.0	<b>0.0001 (M)</b>	0.62	0.77
	I164L	0	0	0	0	1	1	1
<i>pfdhps</i>	S436A	35.1	35.4	30.4	34.0	0.97	0.53	0.8
	A437G	56.8	62.5	69.6	<b>65.0</b>	0.45	0.1 (M)	0.15 (M)
	K540E	0	0	0	0	1	1	1

<sup>a</sup> Both pure mutant and mixed samples were considered mutant for these analyses.  $P$  values are based on the chi-square test. Significant values are in bold type.

this study, administration of SMC as 3 monthly treatments to children in Burkina Faso offered protective efficacies against malaria of 83% for AQ/SP and 77% for DP (Zongo, unpublished). However, there is concern that regular use of AQ/SP or DP will select for parasite polymorphisms that mediate resistance to these regimens. To evaluate how readily key polymorphisms were selected, we compared genotypes of parasites collected at enrollment and 1 month after the third monthly SMC dose. We found that, after SMC, parasites from children who received monthly AQ/SP treatment had selection of multiple SNPs associated with resistance to both AQ and SP. In contrast, selection was not seen in parasites from children who received monthly DP. Thus, DP offered an efficacious alternative to AQ/SP for SMC, and it had the important advantage of not selecting for known resistance determinants.

The effects of AQ/SP on parasite markers of resistance were not surprising. A large body of literature has shown that after treatment for malaria with regimens that included AQ, subsequent infections showed selection of parasites with *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms associated with AQ resistance (19, 20, 26, 34, 35) and with decreased *in vitro* AQ sensitivity (36). Similarly, after treatment with regimens that included SP, subsequent infections showed selection of parasites with *pfldhfr* and *pfldhps* polymorphisms associated with resistance to sulfadoxine and pyrimethamine (20, 26, 35). Our current findings expand observations to the use of AQ/SP for SMC rather than for the treatment of malaria, and they offer a sense of the scale of selection. During one transmission season, after 3 treatments with AQ/SP, the extent of selection was large, especially for the *pfcr* 76T mutation that principally mediates resistance to AQ and for *pfldhfr* mutations that mediate resistance to pyrimethamine. Thus, it is likely that regular use of AQ/SP will profoundly affect the drug resistance profiles of parasites circulating in affected regions, although the impacts of these changes on clinical responses to treatment or SMC are uncertain.

In contrast to the situation with AQ/SP, DP did not select for polymorphisms associated with resistance to aminoquinolines. These results might seem surprising, as piperazine is an aminoquinoline closely related to chloroquine (CQ) and AQ. However, earlier studies from Burkina Faso showed that prior treatment with DP did not select for *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms associated with resistance to CQ and AQ (28). These results differ from those in a recent study in Uganda, in which therapy with DP selected in recurrent infections for *pfmdr1* polymorphisms (86Y and 1246Y) also selected by AQ-containing regimens (29). The reasons for different results between Uganda and Burkina Faso and for differential effects of the different aminoquinolines in Burkina Faso are not known. Piperazine is a much larger molecule than CQ or AQ, and its mechanisms of antimalarial action and resistance are unknown (27). It seems that, if resistance to piperazine currently exists, it may be mediated by factors other than the *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms that mediate resistance to the other aminoquinolines. Interestingly, we saw borderline selection of the wild-type *pfmdr1* D1246 allele after SMC with DP consistent with borderline selection after treatment with DP in one but not in another prior trial in Burkina Faso (28). These modest selections were in the direction opposite that of those seen for DP in Uganda. In any event, the selective impact of piperazine appears to be fundamentally different from that of CQ or AQ.

In comparing parasite genotypes before and after SMC, we

excluded children who experienced an episode of malaria during the trial. This was done to limit the influence on parasite genetics of the current standard antimalarial treatment regimen in Burkina Faso, artemether-lumefantrine. This exclusion obviously limited our analysis to only a subset of trial subjects. However, to obtain adequate sample size, our comparator group that did not receive SMC included children treated for malaria with artemether-lumefantrine during the study (76 of the 92 evaluable children experienced malaria). This information highlights the remarkably high incidence of malaria in our study population but also the important limitation that our control group differed from the children receiving the intervention. It may also be of interest to consider the competing impacts of SMC and treatment regimens. In fact, the standard treatment (artemether-lumefantrine selects in the direction opposite that seen with CQ and AQ for *pfcr* and *pfmdr1* polymorphisms) (20, 37–39), potentially offsetting effects of SMC. Our results may also have been impacted by community changes in parasite genotypes over time. It has been shown elsewhere in West Africa that parasites are more likely to harbor resistance-mediating genotypes during the malaria transmission season, compared to the dry season, presumably due to the selective pressure of frequent malaria therapy (40). However, samples from control subjects who did not receive SMC had the same proportions of tested polymorphisms before and after the period of study, suggesting that community changes in parasite genetics through the transmission season were not responsible for the changes seen before and after SMC.

In summary, we observed that monthly AQ/SP, an effective SMC regimen for the prevention of malaria in Burkina Faso, readily selected for parasites with known SNPs associated with resistance to both AQ and SP. In contrast, monthly DP, which was nearly as efficacious, offered minimal selection of known resistance-mediating polymorphisms. These results highlight the importance of considering drug resistance selection when evaluating chemoprevention regimens. In addition, they identify a potential advantage of DP for SMC in West Africa and, more broadly, for chemoprevention of malaria in other regions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the study children and their parents or guardians, study staff, and the local administrative authorities at Satiri, Balla, and Kadomba for their assistance and support. We thank Chris Dokomajilar for his assistance with laboratory studies.

The clinical trial that provided samples for this study was funded by Holley Cotec, China. The laboratory studies reported in this article were funded by the Doris Duke Charitable Foundation (Distinguished Clinical Scientist Award to P.J.R.) and the National Institutes of Health (AI075045 to P.J.R.).

#### REFERENCES

- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379:413–431. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60034-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60034-8).
- Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, Breckenridge A, Carneiro I, Critchley J, Danquah I, Dodoo A, Kobbe R, Lell B, May J, Premji Z, Sanz S, Severe E, Soulaymani-Bècheikh R, Winstanley P, Adjei S, Anemana S, Chandramohan D, Issifou S, Mockenhaupt F, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Grobusch MP, Kremsner PG, Macete E, Mshinda H, Newman RD, Slutsker L, Tanner M, Alonso P, Menendez C. 2009. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six

- randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* 374:1533–1542. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61258-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61258-7).
3. Wilson AL. 2011. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of intermittent preventive treatment of malaria in children (IPTc). *PLoS One* 6:e16976. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016976>.
  4. Bojang K, Akor F, Bittaye O, Conway D, Bottomley C, Milligan P, Greenwood B. 2010. A randomised trial to compare the safety, tolerability and efficacy of three drug combinations for intermittent preventive treatment in children. *PLoS One* 5:e11225. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011225>.
  5. Dicko A, Barry A, Dicko M, Diallo AI, Tembè I, Dicko Y, Dara N, Sidibe Y, Santara G, Conare T, Chandramohan D, Cousens S, Milligan PJ, Diallo DA, Doumbo OK, Greenwood B. 2011. Malaria morbidity in children in the year after they had received intermittent preventive treatment of malaria in Mali: a randomized control trial. *PLoS One* 6:e23390. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023390>.
  6. Konaté AT, Yaro JB, Ouédraogo AZ, Diarra A, Gansané A, Soulama I, Kangoyé DT, Kaboré Y, Ouédraogo E, Ouédraogo A, Tiono AB, Ouédraogo IN, Chandramohan D, Cousens S, Milligan PJ, Sirima SB, Greenwood B, Diallo DA. 2011. Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Burkina Faso: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 8:e1000408. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000408>.
  7. WHO. 2012. WHO policy recommendation: seasonal malaria chemoprevention (SMC) for Plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. WHO, Geneva, Switzerland.
  8. Smithuis F, Kyaw MK, Phe O, Aye KZ, Htet L, Barends M, Lindegardh N, Singtoroj T, Ashley E, Lwin S, Stepniewska K, White NJ. 2006. Efficacy and effectiveness of dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-mefloquine in falciparum malaria: an open-label randomised comparison. *Lancet* 367:2075–2085. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68931-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68931-9).
  9. Hasugian AR, Purba HL, Kenangalem E, Wuwung RM, Ebsworth EP, Maristela R, Penttinen PM, Laihad F, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. 2007. Dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria. *Clin. Infect. Dis.* 44:1067–1074. <http://dx.doi.org/10.1086/512677>.
  10. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Sere Y, Rosenthal PJ, Ouédraogo JB. 2007. Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperazine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis.* 45:1453–1461. <http://dx.doi.org/10.1086/522985>.
  11. Yeka A, Dorsey G, Kanya MR, Talisuna A, Luge-mwa M, Rwakimari JB, Staedke SG, Rosenthal PJ, Wabwire-Mangen F, Bukirwa H. 2008. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS One* 3:e2390. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002390>.
  12. Lwin KM, Phyto AP, Tarning J, Hanpithakpong W, Ashley EA, Lee SJ, Cheah P, Singhasivanon P, White NJ, Lindegardh N, Nosten F. 2012. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of monthly versus bimonthly dihydroartemisinin-piperazine chemoprevention in adults at high risk of malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1571–1577. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05877-11>.
  13. Cisse B, Cairns M, Faye E, NDiaye O, Faye B, Cames C, Cheng Y, NDiaye M, Lô AC, Simondon K, Trape JF, Faye O, NDiaye JL, Gaye O, Greenwood B, Milligan P. 2009. Randomized trial of piperazine with sulfadoxine-pyrimethamine or dihydroartemisinin for malaria intermittent preventive treatment in children. *PLoS One* 4:e7164. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007164>.
  14. Bigira V, Kapisi J, Clark TD, Kinara S, Mwangwa F, Muhindo MK, Osterbauer B, Aweka FT, Huang L, Achan J, Havlir DV, Rosenthal PJ, Kanya MR, Dorsey G. Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for the prevention of malaria in young Ugandan children: a randomized controlled trial. *PLoS Med.*, in press.
  15. Nankabirwa JJ, Wandera B, Amuge P, Kiwanuka N, Dorsey G, Rosenthal PJ, Brooker SJ, Staedke SG, Kanya MR. 10 March 2014. Impact of intermittent preventive treatment with dihydroartemisinin-piperazine on malaria in Ugandan schoolchildren: a randomized placebo-controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu150>.
  16. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A. 2003. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the Plasmodium falciparum multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:184–187.
  17. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, Durrami N, Leslie T, Rowland M, Hallett RL. 2010. Amodiaquine resistance in Plasmodium falciparum malaria in Afghanistan is associated with the pfcr1 SVMNT allele at codons 72 to 76. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3714–3716. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00358-10>.
  18. Ecker A, Lehane AM, Clain J, Fidock DA. 2012. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* 28:504–514. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.002>.
  19. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Bolaji OM, Sowunmi A, Kyle DE, Milhous W, Wirth DF, Oduola AM. 2006. Association between mutations in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and P. falciparum multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in P. falciparum malaria-infected children in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:155–161.
  20. Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ. 2006. Roles of specific Plasmodium falciparum mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:162–165.
  21. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. 2009. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malar. J.* 8:89. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-8-89>.
  22. Dorsey G, Dokomajilar C, Kiggundu M, Staedke SG, Kanya MR, Rosenthal PJ. 2004. Principal role of dihydropteroate synthase mutations in mediating resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in single-drug and combination therapy of uncomplicated malaria in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:758–763.
  23. Gregson A, Plowe CV. 2005. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol. Rev.* 57:117–145. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.1.4>.
  24. Mockenhaupt FP, Teun Bousema J, Eggelte TA, Schreiber J, Ehrhardt S, Wassilew N, Otchwemah RN, Sauerwein RW, Bienzle U. 2005. Plasmodium falciparum dhfr but not dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana. *Trop. Med. Int. Health* 10:901–908. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01471.x>.
  25. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Lankoande M, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ. 2005. Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and combination therapy for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73:826–832.
  26. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, Guiguemde RT, Rosenthal PJ, Ouédraogo JB. 2007. Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 369:491–498. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60236-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60236-0).
  27. Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF. 2005. Piperazine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs* 65:75–87.
  28. Somé AF, Séré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ. 2010. Selection of known Plasmodium falciparum resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperazine in Burkina Faso. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1949–1954. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01413-09>.
  29. Conrad MD, Norbert LeClair N, Arinaitwe E, Wanzira H, Kakuru A, Bigira V, Muhindo M, Kanya MR, Tappero JW, Greenhouse B, Dorsey G, Rosenthal PJ. 8 March 2014. Comparative impacts over 5 years of artemisinin-based combination therapies on P. falciparum polymorphisms that modulate drug sensitivity in Ugandan children. *J. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu141>.
  30. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Welles TE. 1995. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:565–568.
  31. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. 1998. Plasmodium falciparum:

AQ: B



Somé et al.

- detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp. Parasitol.* 89:1–8. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4274>.
32. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:13–23. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00201-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00201-2).
  33. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diouré Y, Coulibaly D, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellem TE, Plowe CV. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 344:257–263. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200101253440403>.
  34. Holmgren G, Gil JP, Ferreira PM, Veiga MI, Obonyo CO, Bjorkman A. 2006. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfcr1* 76T and *pfmdr1* 86Y. *Infect. Genet. Evol.* 6:309–314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2005.09.001>.
  35. Djimdé AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, Dembele D, Dama S, Ouologuem D, Dicko A, Doumbo OK. 2008. Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:455–461.
  36. Nawaz F, Nsobya SL, Kiggundu M, Joloba M, Rosenthal PJ. 2009. Selection of parasites with diminished drug susceptibility by amodiaquine-containing antimalarial regimens in Uganda. *J. Infect. Dis.* 200:1650–1657. <http://dx.doi.org/10.1086/647988>.
  37. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Sowunmi A, Hudson T, O'Neil M, Milhous W, Wirth DF, Oduola AM. 2009. Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:888–895. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00968-08>.
  38. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJ, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL. 2007. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:991–997. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00875-06>.
  39. Baliraine FN, Rosenthal PJ. 2011. Prolonged selection of *pfmdr1* polymorphisms after treatment of *falciparum* malaria with artemether-lumefantrine in Uganda. *J. Infect. Dis.* 204:1120–1124. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir486>.
  40. Ord R, Alexander N, Dunyo S, Hallett R, Jawara M, Targett G, Drakeley CJ, Sutherland CJ. 2007. Seasonal carriage of *pfcr1* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J. Infect. Dis.* 196:1613–1619. <http://dx.doi.org/10.1086/522154>.

### **ARTICLE NUMERO 3**

**TITRE :** Efficacy and day 7 Plasma Piperaquine Concentrations in African children treated for Uncomplicated Malaria with Dihydroartemisinin-Piperaquine. PLoS One. 2014 Aug 18;9(8)



# Efficacy and Day 7 Plasma Piperazine Concentrations in African Children Treated for Uncomplicated Malaria with Dihydroartemisinin-Piperazine

Issaka Zongo<sup>1</sup>, Fabrice A. Somé<sup>1</sup>, Serge A. M. Somda<sup>2</sup>, Sunil Parikh<sup>3</sup>, Noel Rouamba<sup>1</sup>, Philip J. Rosenthal<sup>4</sup>, Joel Tarning<sup>5,7</sup>, Niklas Lindegardh<sup>5,7</sup>, François Nosten<sup>5,6,7</sup>, Jean Bosco Ouédraogo<sup>1,2\*</sup>

**1** Direction Régionale de l'Ouest, Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **2** Non Transmissible disease department, Centre Muraz Bobo-Dioulasso, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **3** Department of Medicine, Yale University School of Public Health, New Haven, Connecticut, United States of America, **4** Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, **5** Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand, **6** Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Thailand, **7** Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

## Abstract

**Background:** One promising new Artemisinin-based combination therapies (ACTs) is dihydroartemisinin-piperazine (DHA-PQ). However, the pharmacokinetics of piperazine and the relationship between drug levels and clinical efficacy are incompletely characterized, particularly in children.

**Methods:** We performed a single-arm open-label trial in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. A total of 379 participants aged 6 months or more with uncomplicated falciparum malaria were enrolled. Each participant received daily dose of DHA-PQ for three days and followed for 42 days. Parasitological efficacy was analyzed, considering rates of recrudescence and overall recurrence. PK was an exploratory endpoint and a priori, no sample size had been determined. Day 7 capillary and venous plasma concentrations of piperazine were measured in children aged 2–10 years.

**Results:** Of the 379 participants, 365 (96.3%) completed 42 days of follow-up. The median daily dose of PQ was 18.5 mg/kg [6.5–24]. Treatment with DHA-PQ was well tolerated with fever and parasitemia resolution within 48 hours in nearly all children. Recurrent malaria within 42 days of follow-up occurred in 31.3% (10/34) of children less than 2 years old, 16.0% (16/106) of those aged 2–5 years, 9.4% (15/160) of those aged 5–10 years, and none (0/68) of those over 10 years old. After genotyping, 3 of 41 recurrent episodes were recrudescence. An exploratory analysis shows that children with successful treatment outcomes had significantly higher median plasma concentrations of PQ compared to those with recurrent malaria within 42 days after therapy, considering either capillary samples (68 ng/ml [50–85] compared to 48 ng/ml [36–55],  $p < 0.001$ ) or venous samples (42 ng/ml [29–59] compared to 25 ng/ml [19–44],  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** DHA-PQ was effective for uncomplicated *P. falciparum* malaria treatment and offers an alternative to other ACTs. Recurrent malaria was mainly due to new infections after treatment and was correlated with low day 7 PQ concentration in the youngest patients.

**Trial Registration:** Controlled-Trials.com ISRCTN59761234

**Citation:** Zongo I, Somé FA, Somda SAM, Parikh S, Rouamba N, et al. (2014) Efficacy and Day 7 Plasma Piperazine Concentrations in African Children Treated for Uncomplicated Malaria with Dihydroartemisinin-Piperazine. PLoS ONE 9(8): e103200. doi:10.1371/journal.pone.0103200

**Editor:** Steffen Borrmann, Kenya Medical Research Institute - Wellcome Trust Research Programme, Kenya

**Received:** February 17, 2013; **Accepted:** June 24, 2014; **Published:** August 18, 2014

**Copyright:** © 2014 Zongo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This investigation was supported by Holley Cotec Pharma, Beijing, the Fogarty International Center of the National Institutes of Health and the Doris Duke Charitable Foundation, for which PJR is a Distinguished Clinical Scientist. The Mahidol-Oxford-University-Research Unit and the Shoklo-Malaria-Research Unit are supported by the Wellcome Trust of Great Britain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have the following interests: We received money from the Holley Cotec Pharmaceutical Company, Beijing China, and there is no other relation with the company. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* Email: jbouedraogo.irssbobo@fasonet.bf

## Introduction

Artemisinin-based combination therapies (ACTs) are highly effective for the treatment of uncomplicated falciparum malaria [1]. In sub-Saharan Africa, artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine have been widely adopted as first-line therapy. These regimens are generally effective, although artesunate-amodiaquine had lower efficacy in some studies and treatment

with artemether-lumefantrine, which must be dosed twice daily and optimally with fat, is followed by high rates of new infections in areas of high malaria transmission [2,3,4,5]. Among other ACTs recommended by the World Health Organization, artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine has unacceptably poor efficacy due to resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in many areas and artesunate-mefloquine is less well tolerated than other

regimens [6,7]. Another alternative ACT for the treatment of uncomplicated malaria in Africa is dihydroartemisinin-piperaquine (DHA-PQ). Recent studies have reported excellent efficacy and good tolerability of DHA-PQ when used for the treatment of uncomplicated malaria in Africa, with the advantage compared to artemether-lumefantrine of once daily dosing [8,9]. PQ has a half-life of 21–28 days, which is longer than that of lumefantrine (3–4 days), the active amodiaquine metabolite desethylamodiaquine (12 days) or mefloquine (9–15 days [10,11,12,13,14,15,16,17,18]). Long half-life drugs provide longer post-treatment prophylactic effects. Nonetheless, new infections have been seen within a few weeks of therapy with DHA-PQ, due perhaps to the high variability in PQ exposure. In particular, children 2–10 years of age have lower PQ exposures because of higher body weight normalised clearance. This results in lower day 7 PQ concentration compared to older individuals, after standard weight-based dosing, causing an increased risk of recurrent parasitemia [18,19]. To further characterise the impact of pharmacokinetics on DHA-PQ efficacy, we evaluated the efficacy of the drug to treat uncomplicated malaria in children in Burkina Faso and assessed associations between day 7 PQ plasma concentrations and treatment outcomes.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The protocol was approved by the institutional Ethics Committee of Centre Muraz and the Committee on Human Research of the University of California, San Francisco. Written Informed consent for all participants was obtained from their parents or legal guardians prior to enrolment. The study was conducted in accordance with Good Clinical Practice, the declaration of Helsinki, the approved protocol and local regulations. The trial was registered in 2007 (N<sup>o</sup>ISRCTN59761234). The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Checklist S1 and Protocol S1.

### Study site and design

This was an open-label trial in three public health centres (Colsama, Ouezzin-ville and Sarfalao) in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso conducted from August to December 2007. Malaria is holo-endemic in the study area with peak transmission from August to October; almost all infections are due to *Plasmodium falciparum*. Within the main trial of 379 participants, 210 children 2–10 years were enrolled into a population pharmacokinetic exploratory study. The full pharmacokinetics profile of PQ in these children with uncomplicated malaria has been published elsewhere [18]. The present report describes the relationship between day 7 PQ concentrations and parasitological outcomes.

Patients were selected from the outpatient departments of the indicated health centres. Patients age 6 months or older were screened against the inclusion criteria following WHO recommendations [20]: 1) provision of written informed consent, 2) weight >5 kg, 3) history of fever in the past 24 hours or axillary temperature >37.5°C, 4) willingness to comply with 42 days of follow-up, 5) absence of known history of serious side effects from study medications, 6) no evidence of a concomitant febrile illness, 7) no history of treatment with any antimalarial in the past 2 weeks, 8) no danger signs (lethargy, unable to drink or breast feed, repeated vomiting, unable to stand/sit due to weakness) or evidence of severe malaria [1], 9) *P. falciparum* mono-infection with parasite density 2,000–200,000 parasites/ $\mu$ l blood; and 10) haemoglobin >5.0 g/dL. Patients who satisfied these inclusion

criteria were recruited; those excluded were referred to the health centre staff for care.

### Study treatment

Enrolled participants received DHA-PQ (Holleypharm Cotec Beijing Limited, China) administered once daily for 3 days in tablets containing 40 mg of DHA and 320 mg of PQ phosphate. Children were weighed to determine the dosage, which was rounded to the nearest ¼ tablet. The target daily dosages (range) of DHA and PQ phosphate were 2.1 mg/kg (1.7–3.1) and 18 mg/kg (13.3–24.6), respectively. Treatment was directly observed. The study nurses administered all treatments in the clinic with water (no fat was given) and the patients were observed for 30 minutes to ensure that the medications were not vomited. Patients who vomited within 30 minutes of administration were retreated with a second dose at half the original dosage. Any patient who vomited more than once was excluded and referred for treatment with parenteral quinine. Paracetamol (10 mg/kg every 8 hours) was provided for treatment of febrile symptoms. Children with haemoglobin <10 g/dL were treated according to Integrated Management of Childhood Illness guidelines.

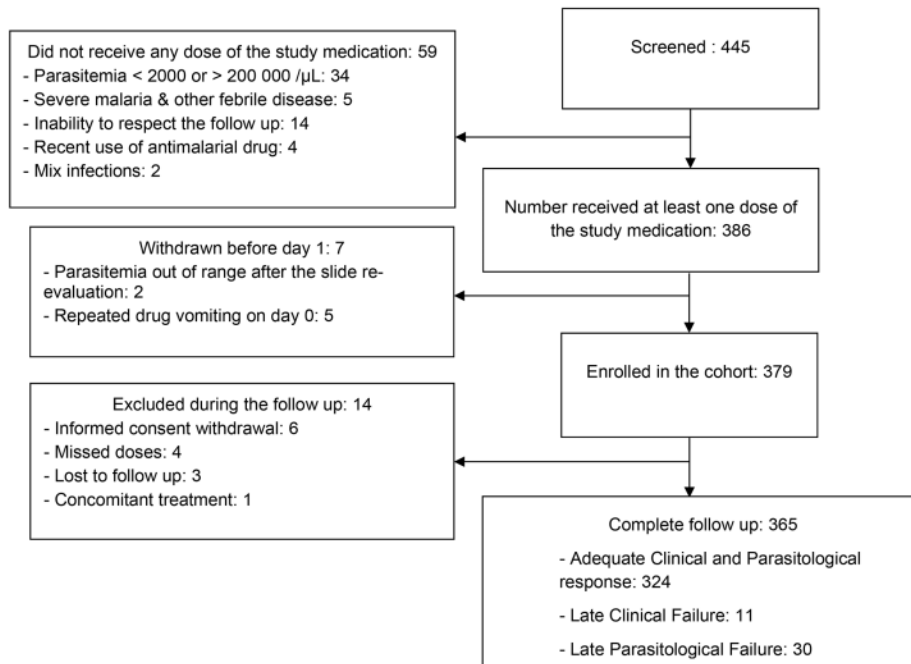
### Follow-up procedures

Patients were asked to return to the health centre for follow up on days 1, 2, 3, 4 and 7, and then weekly for 5 additional weeks after treatment and at any time they were unwell. Each visit included completion of a standardized history form, a physical examination, and, except on day 1, a finger prick for thin and thick blood smear and storage of blood on filter paper for molecular analysis. On day 7, 200  $\mu$ l of capillary blood obtained by finger prick and 2 ml of venous blood were collected. During all visits, any signs or symptoms were recorded. Patients with evidence of severe malaria or danger signs or with treatment failure were referred for treatment with quinine.

### Laboratory procedures

**Diagnosis of malaria and measurement of haemoglobin.** Blood smears were stained with 10% Giemsa for 10 minutes. Parasite densities were calculated from thick smears as the number of asexual parasites per 200 leukocytes (or per 500 leukocytes if the parasite density was <10 parasites per 200 leukocytes), assuming a leukocyte count of 8000/ml. Smears were considered negative when examination of 100 high-power fields did not reveal parasites. Thin blood smears were used for parasite speciation and for gametocyte counts as the number of sexual parasites per 2000 leukocytes. Counts were performed by two technicians; discrepant readings were resolved by a third reader. Haemoglobin was measured at enrolment and on the last day the patient was seen using a portable spectrophotometer (HemoCue, Ängelholm, Sweden).

**Measurement of PQ concentrations.** All capillary and venous blood samples were centrifuged at 2000 g for 10 minutes, and plasma was separated and frozen at –20°C until shipment on dry ice to the Department of Clinical Pharmacology, Bangkok, Thailand. Plasma concentrations of PQ were quantified by a validated liquid chromatographic tandem mass-spectrometric method [21]. For quality control standards at 4.5, 20 and 400 ng/ml were analysed with each batch to ensure precision of the assay. The standard deviation of quality control samples was below 5%, indicating excellent assay performance. The lower limit of quantification was set to 1.50 ng/ml. The Department of Clinical Pharmacology is participating in the World Wide Antimalarial Resistance Network quality control and assurance



**Figure 1. Trial profile.**  
doi:10.1371/journal.pone.0103200.g001

proficiency testing programme (<http://www.wwarn.org/toolkit/gaqc>).

**Molecular analysis.** Whenever blood was collected, 3–4 drops were placed onto filter paper (Whatman 3MM), labelled, air-dried, and stored in sealed plastic bags at ambient temperature. Parasite DNA was subsequently extracted using the Chelex

method [22]. For patients who experienced recurrent malaria after day 6, the samples collected at baseline and at the time of recurrence were genotyped in a stepwise fashion using msp-2, msp-1, and six microsatellites [23]. If, for any of the loci, an allele was not shared between day 0 and the day of recurrence, the infection was classified as a new infection. If at least one allele was

**Table 1.** Characteristics of the enrolled patients at baseline.

Parameters	Age categories				Total (N = 379)
	<2 years (n = 34)	2–4 Years (n = 112)	5–10 Years (n = 165)	>10 years (n = 68)	
Sites					
Colsama	8	38	64	43	153
Ouezzin-Ville	23	41	51	16	131
Sarfalao	3	33	50	9	95
Gender (Male %)	15 (44.1%)	62 (55.4%)	93 (56.4%)	26 (38.2%)	196 (51.7%)
Weight in kg, 95% CI	9.1 (8.6–9.5)	13 (12.5–13.5)	21.3 (20.6–22)	44.5 (40.2–48.8)	21.9 (20.5–23.4)
Temperature, 95% CI	38.8 (38.4–39.1)	38.8 (38.6–38.9)	38.5 (38.4–38.7)	38.1 (37.8–38.3)	38.5 (38.4–38.6)
Mean parasite count (geometric), 95% CI	22657 (14734–34840)	30200 (24699–36926)	26054 (22083–30740)	17925 (13765–23342)	25133 (22483–28095)
Haemoglobin g/dL, arithmetic mean (SD)	8.8 (8.1–9.6)	9.6 (9.3–10)	10.8 (10.5–11.1)	11.9 (11.5–12.4)	10.5 (10.3–10.7)

doi:10.1371/journal.pone.0103200.t001

**Table 2.** Treatment outcome stratified by age groups.

	<2 years	2–4 years	5–10 years	>10 years	Total
Category size	32	106	160	67	365
Median PQ dose in mg/kg <sup>-1</sup> daily (range)	17.8 (15.2–24)	18.9 (11.4–21.8)	18.8 (14.2–24)	16.8 (6.5–19.3)	18.5 (6.5–24)
Early treatment failure	0	0	0	0	0
Late clinical failure, 95% CI	6 (18.7%) [5.2–32.2]	2 (1.9%) [–0.7–4.5]	3 (1.9%) [–2%–4]	0	11 (3%) [12–4.8]
Late parasitological failure, 95% CI	4 (12.5%) [1–24]	15 (14.1%), [7.5–20.7]	11 (6.9%) [–7.1%–21]	0	30 (8.2%) [5.4–11]
Total number recurrence	10	17*	14	0	41
Recrudescence	2	1	0	0	3
New infections	8	15	14	0	37
Adequate clinical and parasitological response, 95% CI	22 (68.7%) [52.6–85]	89 (84%) [77–91]	146 (91.2%) [86.8–95.6]	67 (100%)	324 (88.8%) [85.6–92]

doi:10.1371/journal.pone.0103200.t002

shared between day 0 and the day of recurrence for each locus, the infection was classified as a recrudescence.

**Study endpoints.** The primary endpoint was treatment efficacy (adjusted by genotyping and unadjusted) over 42 days. Outcomes were classified as: 1) early treatment failure (danger signs, complicated malaria, or failure to adequately respond to therapy between days 0 and 3), 2) late clinical failure (danger signs, complicated malaria, or fever and any parasitemia between days 4 and 42), 3) late parasitological failure (any recurrence of parasitemia between days 4 and 42 without fever (axillary temperature  $\geq 37.5^\circ\text{C}$  or history of fever in the past 24 hours) and 4) adequate clinical and parasitological response (no parasitemia over 42 days of follow-up) [20].

Secondary outcomes included the resolution of fever and parasite clearance over the first three days after treatment, the change in haemoglobin level over time, the occurrence of gametocytes, adverse events of any grade during follow-up, and the correlation of day 7 concentrations of PQ and efficacy. Patients were excluded from the efficacy assessment if they used antimalarial drugs outside of the study, if they experienced serious

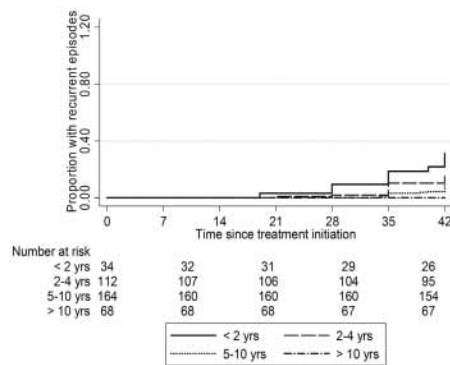
adverse events requiring discontinuation of treatment, or if they withdrew informed consent.

**Sample size and statistical analysis.** Based on a trial in which we reported day 42 unadjusted treatment efficacy of 92.5% for DHA-PQ, we determined that we needed to enrol 379 patients to demonstrate this efficacy with a precision of 5.5%, 80% power and 5% significance level, accounting for a predicted 7.5% loss to follow-up. PK was an exploratory endpoint and a priori, no sample size had been determined. Data were single entered using EPI INFO 6.01 and analysed with STATA 11.0 (STATA Corporation College Station, TX, USA). Efficacy outcomes were analysed by intention to treat and per protocol. Data for patients who were lost to follow-up without a defined primary efficacy outcome were included in the analyses until the last day seen. Day 7 PQ concentration cut-offs of 30 ng/ml for venous samples and 57 ng/ml for capillary samples were used in this analysis, as levels below these cut-offs have been found to predict a higher risk of recrudescence malaria, compared to greater levels, in previous studies [18]. The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare proportions. Normally distributed or log-transformed (when not meeting the normality assumption) continuous variables were compared using the Student's t-test (paired or unpaired). Statistical significance was defined as a p-value below 0.05. We used the Kaplan Meier survival method to estimate the risk of recurrent parasitemia over the period of follow up; patients were censored at the time of withdrawal or recurrent parasitemia. A Cox regression model was used to estimate the hazard ratio of malaria; parameters included in the model were age, weight at entry and day 7 piperaquine concentrations.

## Results

### Study profile and baseline characteristics

Of 445 patients diagnosed with malaria and screened for enrolment, 386 met entry criteria and were enrolled in the study (Figure 1). The main reason for exclusion was parasitemia  $< 2,000/\mu\text{l}$  or  $\geq 200,000/\mu\text{l}$ . Seven participants withdrew on the first day of the study, primarily due to persistent vomiting. Of the 379 enrolled participants who remained in the study on day 1, 96.3% (365/379) completed 42 days of follow-up. The median (range) age of participants was 6 years (0.6–50); 36% of subjects were under 5 years of age. The median (range) daily administered dose of PQ phosphate was 18.5 mg/kg (6.5–24). The baseline characteristics of study subjects are summarised in Table 1. The population



**Figure 2.** Kaplan-Meier estimate of proportion with recurrent parasitemia per age categories.  
doi:10.1371/journal.pone.0103200.g002

**Table 3.** Capillary and venous concentrations of PQ by age.

[PQ] ng/ml	2-5 years, n = 60	6-10 years, n = 126	Total, n = 186	P-value
Capillary sample	62.2 [45.4–83.3]	67.50 [49.6–84.5]	66.70 [48.5–84.4]	0.23
Venus sample	34.00 [24.6–56.8]	41.90 [29.8–63.5]	40.95 [27.3–58.9]	0.02
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	

Median values [interquartile ranges] are shown; Wilcoxon Rank Sum Test; Wilcoxon Paired Sign Rank Test.  
doi:10.1371/journal.pone.0103200.t003

pharmacokinetic study enrolled 226 children 2–10 years of age; this sub-sample provided 226 capillary and 198 venous samples on day 7.

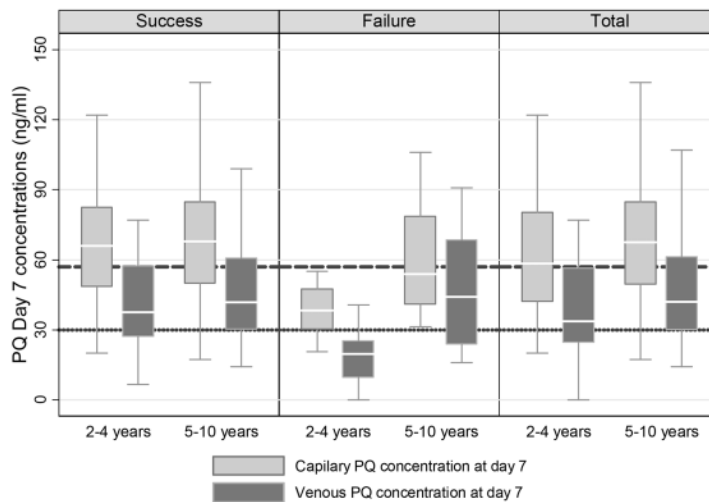
**Treatment efficacy**

Over 42 days of follow up, recurrent parasitemia occurred in 31.3% (10/32) of children less than 2 years old compared to 16% (16/106) in those aged 2–4 years (p = 0.057), 9.4% (15/160) in those aged 5–10 years (p < 0.001) and 0% (0/68) in those aged over 10 years (X<sup>2</sup> test for linear trend = 23.85, p < 0.001; Table 2). Of the enrolled patients, 5.3% (20/379) received a daily dose of piperaquine less than 13.3 mg/kg per day (under dose) and 0.3% (1/379) a child aged 25 months received higher dosage (> 24.6 mg/kg per day). Out of the patients who completed the follow up with assigned clinical outcome, 19 patients were under dosed but presented successful clinical outcome and one (1) child aged 25 months despite he has been over dosed presented a late parasitological failure.

In the patients with recurrent malaria, the time to recurrence was 19 days in those under 2 years of age, 21 days in those 2–4

years old (p = 0.6) and 34 days in those 5–10 years old (p = 0.01) (Figure 2).

When the rate ratio for malaria (treatment failure) was estimated using the Cox regression model, the hazard ratio (HR) decreased as the age increased. Compared to children < 2 years old, the HR was 0.49 (95% CI 0.23–1.03, p = 0.06) for those 2–5 years and 0.15 (95% CI [0.06–0.36] p < 0.001) for those more than 5 years old. Likewise the HR was significantly higher in patients with day 7 capillary piperaquine concentration below the cut off of 57 ng/ml, compared to those with levels above this value (HR 0.24, 95% CI [0.11–.52], p < 0.001) and in patients with low venous concentrations of piperaquine (HR 0.30, 95% CI [0.13–0.70], p = 0.006). Patients with body weight below the median value (18 kg) had a higher hazard ratio (HR 0.25, 95% CI 0.12–0.51], p < 0.001) and each unit (kg) increase in body weight reduced the hazard ratio by 14%, 95% CI [8.9%–19%]. After genotyping, 37 of 41 episodes were classified as new infections, 3 as recrudescence infections, and one was indeterminate (Table 2). The 3 recrudescence cases occurred in two 14 month old children and one 36 month old child, and presented on days 19, 21, and 42 days of follow-up.



**Figure 3.** Box plot for the distribution of PQ concentration by treatment outcome. The dotted lines represent a previously proposed cut-off for piperaquine concentrations quantified in venous (30 ng/ml) and capillary (57 ng/ml) blood samples (Tarning et al. 2012).  
doi:10.1371/journal.pone.0103200.g003

**Table 4.** Plasma concentrations of PQ and treatment outcomes among children 2–10 years.

[PQ] ng/ml	Success, n = 165	Failure, n = 21	Total, n = 186	P-value
Capillary sample	67.80 [50.4–84.8]	47.50 [36–55.4]	66.70 [48.5–84.4]	<0.001
Venous sample	41.60 [29.1–59.4]	25.30 [18.6–44.2]	40.95 [27.3–58.9]	0.010
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	

Success represents adequate clinical and parasitological response; failure represents recurrent parasitemia.  
doi:10.1371/journal.pone.0103200.t004

#### Association between plasma PQ concentrations and treatment outcomes

To evaluate the association between day 7 levels of PQ and treatment outcomes, we conducted a sub-study in a population of 226 children 2–10 years.

In total 226 capillary and 198 venous plasma samples were obtained on day 7 from this population (children 2–10 years old). Median [range] day 7 PQ concentrations were significantly higher in capillary samples (67 ng/ml [49–84]) compared to venous samples (41 ng/ml [27–59]),  $p < 0.001$  (Table 3). Children under 5 years of age, as compared to older children, had significantly lower median day 7 levels in venous blood ( $p = 0.03$ ), but not in capillary blood ( $p = 0.26$ ) (Table 3 and Figure 3). Children with successful treatment outcomes had significantly higher ( $p < 0.001$ ) median [range] plasma concentrations of PQ, compared to those with recurrent malaria, considering either capillary samples (68 ng/ml [50–85]) in successful outcomes and 48 ng/ml [36–55] in children with recurrent malaria) or venous samples (42 ng/ml [29–59] in successful outcomes and 25 ng/ml [19–44] in children with recurrent malaria) (table 4).

#### Fever and parasite clearance, gametocyte carriage and mean haemoglobin change

Parasite clearance was rapid, with parasites cleared within 2 days of initiation of therapy in 98% of episodes (table 5). Over 90% of the patients cleared fever by day one after treatment initiation, and over 99% by day 2 (table 5). Seven patients had gametocytes at enrolment: 3 cleared the gametocytes by day 2, 3 others by day 21 and the last by day 28. All of them remained free of gametocytes up to the end of follow up. The prevalence of gametocytes in the patients free of gametocytes on day 0 was 6%, 4%, 3%, and 2% on day 2, 3, 7, and 14, respectively. Less than 1% had gametocytes from day 21 to 35, and all were free on day 42. Haemoglobin levels increased between day 0 and the last day of follow up; the mean gain was 1.2 g/dL (95%CI [1.0–1.4],  $p < 0.001$ ) and was significantly higher in the patients with an adequate clinical and parasitological response compared to those with recurrent infection (11.9 g/dL versus 10.9 g/dL, mean difference of 0.9 g/dL, 95%CI [0.4–1.5],  $p = 0.001$ ).

#### Treatment acceptability and safety

DHA-PQ was well tolerated. The most common recorded adverse events were vomiting, headache and diarrhoea (table 6). Vomiting within 30 minutes occurred during treatment administration in 5.1% (19/376) of subjects and was not correlated with the dose received. Day 7 PQ concentration was similar in children who vomited within thirty minutes and those who did not. No severe adverse events requiring the discontinuation of treatment were recorded.

#### Discussion

The objectives of this study were to evaluate the efficacy of DHA-PQ for the treatment of uncomplicated falciparum malaria and, in children, to assess associations between day 7 plasma concentrations of PQ and treatment outcomes. DHA-PQ demonstrated excellent treatment efficacy, with good tolerability and safety, although treatment failures, generally due to new infections over 42 days after therapy, were seen in 20% of children less than 5 years of age. In children 2–10 years of age, day 7 PQ concentrations were associated with recurrent malaria after therapy. Children with a day 7 capillary PQ concentration below 57 ng/ml, a previously identified efficacy cut-off, had a higher risk of parasitological recurrence compared to those with a concentration above this threshold [24]. Thus, low blood concentrations of PQ in younger children were associated with inferior treatment efficacy.

Our results support previous reports demonstrating excellent efficacy for DHA-PQ at the same study site and in other parts of Africa [7,9,25,26,27]. DHA-PQ has important advantages over other ACTs. First, it is likely better tolerated than some ACTs, in particular artesunate-amodiaquine and artesunate-mefloquine, although head-to-head comparisons of these regimens in African children are not available. Second, DHA-PQ offers once daily dosing, simplifying treatment compared to artemether-lumefantrine, which must be administered twice-daily with fat [28,29]. Third, due to the long half-life of PQ, DHA-PQ offers a prolonged post-treatment prophylactic effect, translating into lower rates of recurrent malaria compared to other ACTs [25,29]. Considering all these factors, DHA-PQ may be the optimal ACT for the

**Table 5.** Proportion of patients who cleared fever.

Days after initiation of treatment	Number with cleared fever	Proportion	Days after initiation of treatment	No. with cleared parasitemia	Proportion
Day 1 (n = 357)	355	93.8%	Day 2 (n = 350)	325	92.9%
Day 2 (n = 352)	344	97.7%	Day 3 (n = 349)	346	99.1%
Day 3 (n = 351)	345	98.1%	Day 4 (n = 227)	226	99.6%

doi:10.1371/journal.pone.0103200.t005



**Table 6.** Proportion of patients with adverse events of any grade.

Signs/symptoms	Frequency	Percentage
Vomiting within 30 minutes (n = 354)	18	5.1%
Headache (n = 278)	15	5.4%
Vomiting (n = 355)	22	6.2%
Diarrhea (n = 357)	12	3.4%
Anorexia (n = 357)	11	3.1%
Weakness (n = 357)	9	2.5%
Pruritus (n = 356)	9	2.5%
Nausea (n = 294)	4	1.4%

doi:10.1371/journal.pone.0103200.t006

treatment of uncomplicated falciparum malaria in areas of high transmission intensity.

Genotyping to compare initial and recurrent isolates identified only 3 episodes of recrudescence. Thus, the antimalarial efficacy of DHA-PQ was excellent. However, recurrences within 42 days after therapy were common, especially in young children. The benefits of DHA-PQ must be balanced against potential selection by PQ of parasites resistant to this drug. Importantly, resistance to PQ was described some decades ago in China [30]. Although recent definitive evidence of resistance to PQ has not been reported in studies from Africa or Asia, *ex vivo* sensitivity to the drug has varied considerably, and careful continued surveillance of parasite susceptibility is important [31,32,33]. Reassuringly, treatment with DHA-PQ did not select for parasite polymorphisms that are associated with resistance to the related aminoquinolines chloroquine and amodiaquine [34].

DHA-PQ was well tolerated, as reported in previous studies [35,36]. However, 5.1% of patients vomited the drug within 30 minutes after administration. Such information is not usually reported in the assessment of drug tolerability, but vomiting after treatment with DHA-PQ has been noted in other trials [35]. The immediate tolerability of a drug is a key factor for acceptability, especially in children, and it is unclear if vomiting will limit acceptability of DHA-PQ in African children.

## Conclusion

DHA-PQ demonstrated excellent efficacy and was well tolerated in treating uncomplicated falciparum malaria in African children. The regimen is a good alternative to other ACTs for the treatment of uncomplicated malaria. However, in children recurrent infections were common after treatment and associated

with low PQ drug concentrations, suggesting that current dosage recommendations for DHA-PQ in young children need re-evaluation to provide optimum post-exposure prophylaxis in this vulnerable group.

## Supporting Information

### Table S1 Day 7 Concentration of Piperaquine and Vomiting within 30 Minutes following the Treatment Administration.

(DOC)

### Checklist S1 CONSORT Checklist.

(DOC)

### Protocol S1 Day 7 Plasma Piperaquine Concentrations and Dihydroartemisinin-Piperaquine Efficacy in Children Treated for Uncomplicated Malaria in Burkina Faso.

(DOC)

## Acknowledgments

We thank the patients and their parents/legal guardians, the field study team, and the health centre authorities. We also thank Bryan Greenhouse for assistance with parasite genotyping.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JBO IZ FN PJR JT NL. Performed the experiments: IZ FS NR. Analyzed the data: IZ SS. Contributed reagents/materials/analysis tools: SP. Wrote the paper: JBO IZ FN PJR JT NL SP NR FS SS.

## References

- WHO (2010) Guidelines for the treatment of malaria, second edition.
- Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, et al. (2005) Amodiaquine alone, amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet* 365: 1474–1480.
- Bukirwa H, Yeka A, Kanya MR, Talisuna A, Banek K, et al. (2006) Artemisinin combination therapies for treatment of uncomplicated malaria in Uganda. *PLoS Clin Trials* 1: e7.
- Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, et al. (2007) Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 369: 491–498.
- Dorsey G, Staedke S, Clark TD, Njama-Meya D, Nzarubara B, et al. (2007) Combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: a randomized trial. *Jama* 297: 2210–2219.
- Dorsey G, Njama D, Kanya MR, Cattamanchi A, Kyabayinze D, et al. (2002) Sulfadoxine/pyrimethamine alone or with amodiaquine or artesunate for treatment of uncomplicated malaria: a longitudinal randomised trial. *Lancet* 360: 2031–2038.
- Smithuis F, Kyaw MK, Phe O, Aye KZ, Htet L, et al. (2006) Efficacy and effectiveness of dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-mefloquine in falciparum malaria: an open-label randomised comparison. *Lancet* 367: 2075–2085.
- Yeka A, Dorsey G, Kanya MR, Talisuna A, Lugenwa M, et al. (2008) Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS ONE* 3: e2390.
- Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Sere Y, et al. (2007) Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Burkina Faso. *Clin Infect Dis* 45: 1453–1461.

10. Tarning J, Ashley EA, Lindegardh N, Stepniewska K, Phaiphun L, et al. (2008) Population pharmacokinetics of piperazine after two different treatment regimens with dihydroartemisinin-piperazine in patients with *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1052–1061.
11. Tarning J, McGready R, Lindegardh N, Ashley EA, Pimanpanarak M, et al. (2009) Population pharmacokinetics of lumefantrine in pregnant women treated with artemether-lumefantrine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3837–3846.
12. Gutman J, Green M, Durand S, Rojas OV, Ganguly B, et al. (2009) Mefloquine pharmacokinetics and mefloquine-artesunate effectiveness in Peruvian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 8: 58.
13. Krudsood S, Looareesuwan S, Tangpakdee N, Wilairatana P, Phumratanaprapin W, et al. (2010) New fixed-dose artesunate-mefloquine formulation against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in adults: a comparative phase III safety and pharmacokinetic study with standard-dose nonfixed artesunate plus mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3730–3737.
14. Ashley EA, Stepniewska K, Lindegardh N, McGready R, Hutagalung R, et al. (2006) Population pharmacokinetic assessment of a new regimen of mefloquine used in combination treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2281–2285.
15. Salman S, Page-Sharp M, Griffin S, Kose K, Siba PM, et al. (2011) Population pharmacokinetics of artemether, lumefantrine, and their respective metabolites in Papua New Guinean children with uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5306–5313.
16. Rijken MJ, McGready R, Phyo AP, Lindegardh N, Tarning J, et al. (2011) Pharmacokinetics of dihydroartemisinin and piperazine in pregnant and nonpregnant women with uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5500–5506.
17. Tarning JCP, Jullien V, Rijken MJ, Bergstrand M, Cammas M, et al. (2012) Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of amodiaquine and desethylamodiaquine in women with *Plasmodium vivax* malaria during and after pregnancy. *Antimicrob Agents Chemother*: 5764–5773. doi: 10.1128/AAC.01242-01212
18. Tarning J, Zongo I, Some FA, Rouamba N, Parikh S, et al. (2012) Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperazine in children with uncomplicated falciparum malaria. *Clin Pharmacol Ther* 91: 497–505.
19. Creek DJ, Bigira V, McCormack S, Arinaitwe E, Wanzira H, et al. (2013) Pharmacokinetic predictors for recurrent malaria after dihydroartemisinin-piperazine treatment of uncomplicated malaria in Ugandan infants. *J Infect Dis* 207: 1646–1654.
20. WHO (2003) Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria.
21. Tarning J, Singtoroj T, Annerberg A, Ashton M, Bergqvist Y, et al. (2006) Development and validation of an automated solid phase extraction and liquid chromatographic method for the determination of piperazine in urine. *J Pharm Biomed Anal* 41: 213–218.
22. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellemes TE (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 52: 565–568.
23. Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, et al. (2006) Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg* 75: 836–842.
24. Tarning J, Lindegardh N, Annerberg A, Singtoroj T, Day NP, et al. (2005) Pitfalls in estimating piperazine elimination. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 5127–5128.
25. Bassat Q, Mulenga M, Tinto H, Piola P, Borrmann S, et al. (2009) Dihydroartemisinin-piperazine and artemether-lumefantrine for treating uncomplicated malaria in African children: a randomised, non-inferiority trial. *PLoS One* 4: e7871.
26. Karema C, Fanello CI, van Overmeir C, van Geertruyden JP, van Doren W, et al. (2006) Safety and efficacy of dihydroartemisinin/piperazine (Artekin) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Rwandan children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 1105–1111.
27. Arinaitwe E, Sandison TG, Wanzira H, Kakuru A, Homby J, et al. (2009) Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for falciparum malaria: a longitudinal, randomized trial in young Ugandan children. *Clin Infect Dis* 49: 1629–1637.
28. Omari AA, Gamble C, Garner P (2005) Artemether-lumefantrine (six-dose regimen) for treating uncomplicated falciparum malaria. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005564.
29. Nambozi M, Van Geertruyden JP, Hachizovu S, Chaponda M, Mukwamataba D, et al. (2011) Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperazine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Zambian children. *Malar J* 10: 50.
30. Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF (2005) Piperazine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs* 65: 75–87.
31. Hao M, Jia D, Li Q, He Y, Yuan L, et al. (2013) In vitro sensitivities of *Plasmodium falciparum* isolates from the China-Myanmar border to piperazine and association with polymorphisms in candidate genes. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 1723–1729.
32. Lim P, Wongsrichanalai C, Chhin P, Khim N, Kim S, et al. (2013) Decreased in vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to artesunate, mefloquine, chloroquine, and quinine in Cambodia from 2001 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2135–2142.
33. Nsohya SL, Kiggundu M, Nanyunja S, Joloba M, Greenhouse B, et al. (2010) In vitro sensitivities of *Plasmodium falciparum* to different antimalarial drugs in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1200–1206.
34. Some AF, Sere YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, et al. (2010) Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperazine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1949–1954.
35. Katrak S, Gasasira A, Arinaitwe E, Kakuru A, Wanzira H, et al. (2009) Safety and tolerability of artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperazine for malaria in young HIV-infected and uninfected children. *Malar J* 8: 272.
36. Denis MB, Davis TM, Hewitt S, Incardona S, Nimol K, et al. (2002) Efficacy and safety of dihydroartemisinin-piperazine (Artekin) in Cambodian children and adults with uncomplicated falciparum malaria. *Clin Infect Dis* 35: 1469–1476.