

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SUPERIEURS DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES
DE LA SANTE (ED- SDS)

FORMATION DOCTORALE EN
PARASITOLOGIE MEDICALE

Année académique 2016-2017

BURKINA FASO

Unité - Progrès - Justice



Thèse N° 04

Etude de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques de première intention et du rôle de son polymorphisme dans la symptomatologie du paludisme au Burkina

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 11 Janvier 2017

**Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Polytechnique
de Bobo-Dioulasso en
Parasitologie médicale**

Par

SONDO Paul

JURY :

Directeur de these :

Mr Halidou TINTO,
Directeur de Recherche,
IRSS/CNRST, Burkina Faso

Président :

M^{me} Marielle Bouyou AKOTET, Professeur Titulaire,
Université des Sciences de la Santé, Libreville, Gabon

Membres :

- **Mr Halidou TINTO**, Directeur de Recherche, IRSS/CNRST,
Burkina Faso

- **M^{me} Sanata BAMBA**, Maître de Conférences agrégé,
INSSA,/UPB, Burkina Faso

Rapporteurs :

- **Mr William YAVO**, Maître de Conférences agrégé, Université
Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan, Côte D'Ivoire

- **M^{me} Marielle Bouyou AKOTET**, Professeur Titulaire,
Université des Sciences de la Santé, Libreville, Gabon

- **Mr Roger Clément TINE**, Maître de Conférences agrégé,
Université Cheick Anta Diop de Dakar, Sénégal

Dédicaces

A vous,

Sondo Noraogo Barthélémy, mon père

Kafando Rimgninga Marie Jeanne, ma mère

Sawadogo Noélie, mon épouse

Sondo Tégawendé Bruno, mon fils

Je dédie ce travail. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini.

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de SANOFIS AVENTIS et OMS-TDR (pour la collecte des données) à travers le projet «Pharmacovigilance des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine en Afrique». Il est aussi l'œuvre de la bonne collaboration entre l'Unité de Recherche Clinique de Nanoro (URCN) et l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) d'Anvers en Belgique à travers le programme «FA3-DGCD» (pour les analyses moléculaires).

Je tiens à cœur d'exprimer ma plus vive gratitude, à mon Directeur de thèse, **Dr Halidou Tinto** pour m'avoir fait confiance malgré mes limites en matière de recherche, pour m'avoir guidé, conseillé et encouragé. Cher Maître, sans vous, cette thèse ne serait pas. Au-delà de votre investissement sans faille pour la réalisation de ce travail, j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines d'écoute, de sympathie et de compréhension. Prenez ces lignes comme l'expression de la gratitude qui anime mon cœur.

Je tiens aussi à cœur de témoigner ma profonde reconnaissance au **Pr Tinga Robert Guiguemdé** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant mon inscription en thèse de Parasitologie Médicale à l'École Doctorale des Sciences de la Santé (ED-SDS) de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB). Professeur, vous m'avez initié à l'étude des parasites et vos enseignements témoignent d'une authenticité pratique. Du fond du cœur, merci.

Je remercie **Dr Sanata Bamba**, qui assure actuellement la direction scientifique de l'école doctorale ED-SDS et qui a autorisé et organisé la soutenance de cette thèse.

Mes cordiaux remerciements vont aux rapporteurs, **Dr William Yavo** de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan en Côte-D'Ivoire, **Pr Marielle Bouyou Akotet** de l'Université des Sciences de la Santé de Libreville au Gabon et **Dr Roger Clément Tine** de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar au Sénégal pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce modeste travail.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe pédagogique et les différents intervenants dans cette école doctorale, pour leur suivi pédagogique.

Au Professeur **Jean Bosco Ouédraogo** qui a participé activement à ma formation, j'adresse mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier profondément **Pr Umberto D'alessandro** et **Dr Ambrose Talisuna** pour leur profonde implication pour la finalisation du protocole de l'étude «Pharmacovigilance des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine en Afrique».

J'exprime mes sincères remerciements à l'égard de tout le personnel du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso en particulier **Dr Nicolas Méda** (Directeur Général) et toute l'équipe de recherche de l'Unité Paludisme et Maladies Tropicales Négligées pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire pour les analyses moléculaires.

Je remercie **Dr Ellis Owusu-Dabo** de «Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine» (KCCR), au Ghana pour m'avoir accueilli dans son centre pour la rédaction de ma thèse.

J'exprime ma reconnaissance à l'égard de tous les membres de l'équipe de l'étude «Pharmacovigilance des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine en Afrique», en particulier **Mr Karim Derra** (coordonnateur de site), **Dr Zekiba Tarnagda** (superviseur de terrain), **Dr Isidore Traoré** (Moniteur), **Dr Seydou Diallo Nakanabo** (Clinicien), **Mr Adama Kazienga** (gestionnaire de données), et **M^{me} Odile Zampa** (Technologiste biomédical) pour leur profonde implication dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont à tout le personnel de l'Unité de Recherche Clinique de Nanoro en particulier **Dr Innocent Valéa**, responsable adjoint de l'unité et chargé de l'assurance qualité, **Dr Marc Christian Tahita**, responsable des essais cliniques, **Dr Athanase Somé**, responsable de la section clinique, **Dr Hermann Sorgho**, **Dr Maminata Traoré**, **Dr Sandrine Yara**, responsable de la pharmacie, **Mr Magloire Natama**, responsable du service des laboratoires, **Mr Eli Roamba**, géographe, **Mr Sayouba Ouédraogo**, responsable de la section gestion des données, **Mr Abdou Nassirou Diandé**, responsable de la section réseau informatique et **Mr Yacouba Barry**, responsable de la logistique pour leur soutien et leur contributions diverses pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tout le personnel du CMA saint Camille de Nanoro et du District Sanitaire de Nanoro en particulier les responsables et agents des Centres de Santé et de Promotion Sociale de Nanoro et de Nazoanga pour leur bonne collaboration.

Mes sincères remerciements vont au **Dr Thierry Lefèvre** pour tout le soutien qu'il m'a apporté dans le cadre de la rédaction de cette thèse.

Je remercie mes collaborateurs, **Dr Constant Sirima, Mr Diallo Salou, Mr Ousmane Traoré, Mr Palpougouini Lompo, Mr Lassina Yaro, Mr François Kiemdé, Dr Bihoun Biebo, Dr Issa Guiraud, Dr Bérenger Kaboré, Dr Olivier Sombié, Dr Fabrice Somé, Dr Mamadou Cissé, Dr Guékon Lougué et Dr Léa Bonkian** pour leurs contributions diverses.

J'exprime ma reconnaissance à **Mr Emile Kafando, Mr Salam Kafando, Mme Yvette Kafando, Mr Basile Darga, Mr Alexis Kafando, Mr Blaise Sondo, Mr Pierre Sondo, Mr Abdoulaye Sondo, Mr Issa Warma, Mr Félix Ouédraogo, Mr Karzoum Ilboudo, Mr Wendimineré Djiguemdé, Mr Adama Djiguemdé, Mr Seydou Guiguemdé et Mr Amadou Sibalo** pour leurs encouragements et leurs multiples conseils.

Je remercie mes camarades d'école, **Mr Bienvenu Yaméogo, Mr Moussa Sylla, Dr Marcel Sawadogo, Dr Amadou Tapilly, Dr Bakary Sidibé et Dr Inoussa Dindané** pour leurs encouragements.

Mes remerciements vont également à l'égard des participants à cette étude (enfants, parents et tuteurs) pour leur compréhension et leur acceptation de participer à l'étude ainsi qu'à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Trouvez en cette thèse, l'expression de ma grande reconnaissance. Que Dieu vous bénisse!

Sigles et abréviations

Ac	: Anticorps
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
<i>Ama I</i>	: Apical membrane antigen I (Antigène 1 de la membrane apicale)
AL	: Artéméther-Luméfantrine
ASAQ	: Artésunate-Amodiaquine
ASMQ	: Artésunate-Méfloquine
ASSP	: Artésunate-Sulfadoxine pyriméthamine
Chr	: Chromosome
CI	: Concentration inhibitrice
CMA	: Centre médical avec antenne chirurgicale
CRF	: Case Record Form (formulaire de report des cas)
CSPS	: Centre de Santé et de Promotion Sociale
CTA	: Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
DDT	: Dichlorodiphényltrichloréthane
dNTP	: desoxynucléotide triphosphate
DP	: Densité parasitaire
DSN	: District Sanitaire de Nanoro
EA	: Effet adverse
ECT	: Echec clinique tardif
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
EPT	: Echec parasitologique tardif
ETG	: Echec thérapeutique global
ETP	: Echec thérapeutique précoce
FM	: Frottis mince
GE	: Goutte épaisse
<i>Glurp</i>	: Glutamate Rich Protein
GRP	: Globule rouge parasité
Hb	: Taux d'hémoglobine
IC	: Intervalle de confiance

IP	: Indice plasmodique
IRSS	: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
J	: Jour
LRT	: Likelihood ratio test
MILDA	: Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action
<i>MOI</i>	: Multiplicity of infection
MS	: Ministère de la santé
<i>msp1</i>	: Merozoite surface protein 1 (protéine 1 de surface du mérozoïte)
<i>msp2</i>	: Merozoite surface protein 2 (protéine 2 de surface du mérozoïte)
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NEB	: New England Biolab
NI	: Nouvelle infection
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
Pb	: Paire de base
PCR	: Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
<i>Pfprt</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter gene
<i>PfEMP-1</i>	: <i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
<i>PfHRP2</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> histidin rich protein 2
<i>Pfmdr1</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance gene
PID	: Pulvérisation intra-domiciliaire
pLDH	: <i>Plasmodium</i> lactate déshydrogénase
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
QBC	: Quantitative buffy coat
RCPA	: Réponse clinique et parasitologique adéquate
rpm	: revolution per minute
RPMI	: Roosevelt Park Medium Institute
TBE	: Trizma-Acide Borique- EDTA
TDR	: Test de diagnostic rapide
TPI	: Traitement préventif intermittent
URCN	: Unité de Recherche Clinique de Nanoro
UV	: Ultra-violet
VNP	: Visite non programmée

Liste des tableaux

Tableau I: Programme et activités menées au cours du suivi de 28 jours des participants à l'étude	50
Tableau II: Programme d'amplification et séquence des amorces utilisées pour les génotypage de <i>msh1</i> et <i>msh2</i>	54
Tableau III: composition des mélanges de la pcr pour le génotypage de <i>msh1</i> et <i>msh2</i>	55
Tableau IV: Caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques de la population à l'inclusion	59
Tableau V: Résultats de l'évaluation de l'efficacité du traitement par bras	60
Tableau VI: Réponse au traitement par tranche d'âge	61
Tableau VII: réponse au traitement en fonction de la saison	64
Tableau VIII: Résultats de tolérance par bras de traitement	68
Tableau IX: Prévalence des familles alléliques de <i>msh1</i> et <i>msh2</i> par site de collecte	76
Tableau XI: Programmes d'amplification et séquences des amorces pour la détection de mutations au niveau des gènes <i>pfprt</i> et <i>pfmdr1</i>	89
Tableau XII: Mélange réactionnel des pcr pour la détection de mutations au niveau des gènes <i>pfprt</i> et <i>pfmdr1</i>	90
Tableau XIII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfprt</i> k76t	91
Tableau XIV: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfmdr1</i> - n86y	92
Tableau XV: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfmdr1</i> - y184f.....	93
Tableau XVI: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfmdr1</i> - s1034c.....	94
Tableau XVII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfmdr1</i> - n1042d	95
Tableau XVIII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation <i>pfmdr1</i> - d1246y	96

Tableau XIX: Prévalence des allèles de <i>pfcr1</i> et <i>pfmdr1</i> avant et après le traitement avec AL	100
Tableau XX: Prévalence des allèles <i>pfcr1</i> et <i>pfmdr1</i> avant et après le traitement avec ASAQ	101
Tableau XXI: Analyse multi variée de la relation entre les allèles de <i>pfcr1</i> et <i>pfmdr1</i> et les échecs au traitement avec AL	102
Tableau XXII: Analyse multi variée de l'association entre les allèles des gènes <i>pfcr1</i> et <i>pfmdr1</i> et les échecs au traitement avec ASAQ	103

Liste des figures

Figure 1: Ultrastructure du complexe apical au niveau du mérozoïte.....	7
Figure 2 : Morphologie des différents stades sanguins par espèce	8
Figure 3: Mécanisme d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte.....	11
figure 4: Cycle biologique des Plasmodies	12
Figure 5: Cycle évolutif du moustique.....	15
Figure 6: Variation du risque d'infection pour les individus vivant en zone d'endémie	19
Figure 7: Organisation des régions sub-téломériques des chromosomes de <i>P. falciparum</i>	29
Figure 8: Représentation de la structure de <i>msp1</i>	32
Figure 9: Représentation de la structure des deux familles alléliques de <i>msp2</i>	33
Figure 10: Représentation schématique de la structure du <i>glurp</i>	34
Figure 11: Cartographie de la zone d'étude	47
Figure 12: Flux des participants depuis la sélection jusqu'à la fin du suivi de 28 jours.....	58
Figure 13: Risque de recrudescence par bras de traitement	62
Figure 14: Risque de nouvelle infection par bras de traitement.....	63
Figure 15: Fluctuation temporaire de la rcpa non corrigée par pcr par bras de traitement	65
Figure 16: Fluctuation temporaire de la rcpa après correction par pcr par bras de traitement	66
Figure 17: Evolution du taux de portage des gamétocytes par bras de traitement.....	67
Figure 18: Evolution du taux d'hémoglobine par bras de traitement.....	69
Figure 19: Effet de la variabilité allélique de <i>msp1</i> et de <i>msp2</i> sur la densité parasitaire.....	78
Figure 20: Effet de la variabilité allélique de <i>msp1</i> et de <i>msp2</i> sur la température corporelle	80
Figure 21: Effet de la variabilité allélique de <i>msp1</i> et de <i>msp2</i> sur le taux d'hémoglobine	82
Figure 22: Fluctuation temporaire des allèles du <i>pfprt</i> (codon 76).....	98
Figure 23: Diagramme d'inclusion montrant le nombre d'échantillons analysés avec succès	99

Résumé

Introduction: La chimiorésistance et le polymorphisme du parasite *Plasmodium falciparum* comptent parmi les principaux obstacles à la lutte contre le paludisme. Cette étude avait pour objectif de mesurer l'efficacité thérapeutique des combinaisons Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artéméther-Luméfantrine (AL) dans les conditions réelles de leur utilisation et d'évaluer la pression sélective de ces traitements sur la population parasitaire à travers l'étude des mutations des gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1*. Elle visait aussi à déterminer le profil génétique des isolats en circulation dans la zone de Nanoro et leur impact sur la sévérité de la maladie.

Méthodologie: Un essai clinique randomisé a été conduit entre Septembre 2010 et Octobre 2012 dans le district sanitaire de Nanoro. Des patients atteints de paludisme à *P. falciparum* ont été enrôlés et traités avec AL ou ASAQ, en prise non supervisée, puis suivi pendant 28 jours. Les protéines 1 et 2 de surface du mérozoïte (*msh1* et *msh2*) ont été utilisées comme marqueurs de polymorphisme pour distinguer les populations parasitaires. La pression sélective des traitements a été évaluée par une analyse des marqueurs moléculaires de la résistance (mutations au niveau des gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1*).

Résultats: Au total, 1480 patients ont été examinés parmi lesquels, 680 ont été inclus pour l'étude de l'efficacité thérapeutique des deux traitements. Le taux de guérison à l'issue des 28 jours de suivi était de 77,8% pour AL et 84,1% pour ASAQ. Certaines souches comme celles de type MAD20 de *msh1* et FC27 de *msh2* étaient beaucoup plus associées à la sévérité de la maladie. AL sélectionnait les souches sauvages des gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1* pendant que ASAQ sélectionnait les souches mutantes.

Conclusion: Dans les conditions réelles d'utilisation, il y a une baisse d'efficacité des traitements antipaludiques de première intention au Burkina Faso. Certaines souches de *P. falciparum* étaient beaucoup plus associées à la sévérité de la maladie. Les deux traitements avaient des effets antagoniques dans la sélection de souches parasitaires. Cela confirme l'effet bénéfique de l'adoption des deux CTA à la fois comme traitement de première intention, car cela permet de réduire la pression sélective exercée par chaque médicament.

Summary

Background: *Plasmodium falciparum* resistance to anti-malarial drugs and its genetic polymorphism represent major challenges for the control of malaria. This study aimed to assess the effectiveness of Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) and Artemether-Lumefantrine (AL) used according to routine practices and to determine their impact on circulating parasites population through the investigation of mutations in *Pfcr* and *Pfmdr1* genes. It also aimed to determine the genetic profile of the circulating parasite population in Nanoro area and its impact on the severity of the disease.

Methods: A randomized clinical trial was carried out from September 2010 to October 2012 in Nanoro Health district. Patients with falciparum malaria were enrolled and were treated unobserved with either AL or ASAQ and were followed-up for 28 days. Merozoite surface proteins 1 and 2 (*msp1* and *msp2*) were used as polymorphic markers to distinguish parasite populations. The selective pressure of the treatments was assessed by monitoring the resistance molecular markers (mutations in *Pfcr* and *Pfmdr1* genes).

Results: Out of 1480 patients screened, 680 were enrolled in the effectiveness study. By 28 days, a PCR corrected cure rate of 77.8% for AL and 84.1% for ASAQ was reported. Some specific strains such as MAD20 of *msp1* and FC27 of *msp2* were mostly associated with disease severity. The wild strains of *Pfcr* and *Pfmdr1* genes were selected after treatment with AL while the mutant strains were selected after treatment with ASAQ.

Conclusion: In real life, there is a decrease of the cure rate of the two first line antimalarial treatments in Burkina Faso. Some *P. falciparum* strains were mostly associated with the severity of the disease. The two treatments exerted opposite trend in selecting parasite strains. This confirms the potential beneficial effect of adopting the two drugs at the same time as first line treatments to avoid the selective pressure by each treatment regimen.

Sommaire

Dedicaces	i
Remerciements	II
Sigles et Abréviations.....	V
Liste des Tableaux.....	VII
Liste des Figures.....	IX
Résume	X
Summary	XI

CHAPITRE 1: Introduction générale, objectifs et organisation du manuscrit de thèse..... 1

I. Introduction générale.....	1
II. Objectifs de la thèse	3
III. Organisation de la thèse	4

CHAPITRE 2: Revue de la littérature sur le paludisme, le polymorphisme génétique et la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* 5

I. Généralités sur le paludisme	5
1. Définition.....	5
2. Taxonomie, morphologie et biologie du parasite	5
3. Cycle de développement du parasite	9
4. Taxonomie et Biologie du vecteur.....	12
5. Cycle de développement des anophèles	14
6. La transmission du paludisme	15
7. Mesure de la transmission	16
8. Les manifestations cliniques du paludisme	17
9. Immunité anti –plamodiale: notion de prémunition	18

10. Diagnostic du paludisme	19
11. Traitement du paludisme	22
12. Prévention du paludisme	24
II. Polymorphisme génétique de <i>P. falciparum</i>	28
1. Le génome des plasmodiums	28
2. Origine de la diversité génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	30
3. Les gènes polymorphiques de <i>P. falciparum</i>	31
III. La chimiorésistance de <i>P. falciparum</i> et les marqueurs moléculaires de la résistance	34
1. Définition.....	34
2. Historique de la Chimiorésistance	35
3. Mécanisme de résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques.....	35
4. Méthodes d'études de la chimiorésistance.....	37
5. Facteurs favorisant la résistance aux antipaludiques.....	42

CHAPITRE 3: Efficacité et tolérance de artesunate-amodiaquine comparée a artemether-lumefantrine en conditions réelles d'utilisation au Burkina Faso	45
I. Introduction.....	45
II. Matériel et Méthodes.....	46
1. Site de l'étude	46
2. Type, population et période d'étude	47
3. Administration des traitements, suivi des patients et collecte des données	48
4. Examens microscopiques des lames de goutte épaisse et de frottis mince	50
5. Critères d'évaluation de l'efficacité thérapeutiques et de la tolérance des deux traitements.....	51
6. Analyses moléculaires	53
7. Traitement et analyse des données	56
III. Résultats	57
1. Les caractéristiques de la population à l'inclusion	58

2.	Efficacité thérapeutique à l'issu des 28 jours de suivi.....	59
3.	L'influence de la saison sur l'efficacité des traitements.....	63
4.	Impact des deux traitements sur le portage des gamétocytes.....	66
5.	La tolérance des deux traitements.....	67
IV.	Discussion.....	69
	Conclusion	72

CHAPITRE 4: Relation entre la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et la symptomatologie du paludisme chez les humains 73

I.	Introduction.....	73
II.	Matériel et Méthodes.....	74
III.	Résultats	75
1.	La densité parasitaire	77
2.	La température corporelle.....	79
3.	Le taux d'hémoglobine.....	81
IV.	Discussion.....	83
	Conclusion	85

CHAPITRE 5: Etude de la relation entre les traitements artesunate-amodiaquine (ASAQ) et artemether-lumefantrine (AL) et les mutations des gènes *Pfcr* et *Pfmdr1* a Nanoro, Burkina Faso 87

I.	Introduction.....	87
II.	Matériel et Méthodes.....	88
1.	Origines des échantillons.....	88
2.	Analyses moléculaires	88
3.	Analyse statistique.....	96
III.	Résultats	97
1.	La réponse clinique et parasitologique	97

2. Evolution de la prévalence de la mutation <i>Pfcr</i> K76T cinq ans après le retrait de la chloroquine	97
3. Prévalence à l'inclusion des allèles <i>Pfcr</i> et <i>Pfmdr1</i> par groupe de traitement	98
4. Impact du traitement sur la sélection d'allèle <i>Pfcr</i> et <i>Pfmdr1</i>	100
5. Relation entre la présence d'allèles <i>Pfcr</i> et <i>Pfmdr1</i> et les échecs au traitement	101
IV. Discussion.....	103
Conclusion	106
CHAPITRE 6: Discussion générale et implications pour la santé publique	107
Conclusion Générale	110
Perspectives.....	111
Références Bibliographiques.....	112
Annexes	130
Annexe 1: Procédure d'extraction de l'ADN plasmodial à partir des confettis par la méthode du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)	130
Annexe 2: Liste et code à une et trois lettres des acides aminés	132
Annexe 3: Guide pour la graduation des symptômes	133
Annexe 4: Photo PCR prise le 04/03/13 (e) de la famille allélique MAD20 de <i>msp1</i>	134
Annexe 5: Photo PCR prise le 03/02/14 (f) pour la détection de la mutation <i>Pfcr</i>	135
Annexe 6: Photo PCR prise le 16/04/14 (d) pour la détection de la mutation <i>Pfmdr1</i> N86Y	136
Annexe 7: Liste des publications	137

Chapitre 1: Introduction générale, objectifs et organisation du manuscrit de thèse

I. Introduction générale

Le paludisme est l'endémie parasitaire la plus répandue dans le monde avec près de la moitié de la population mondiale qui y est exposée. Selon le rapport 2016 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 212 millions de personnes sont atteintes du paludisme, entraînant la mort d'environ 429 000 d'entre elles. La plupart des décès surviennent en Afrique Sub-Saharienne et les enfants de moins de cinq ans ainsi que les femmes enceintes sont les plus touchés (WHO, 2016).

Au Burkina Faso, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique. Il représente le premier motif de consultation, d'hospitalisation et de décès dans les formations sanitaires du pays (MS, 2012). Au cours de l'année 2016, 6 922 857 cas confirmés de paludisme par les Tests de Diagnostic Rapide (TDR) ont été enregistrés au niveau national dont 5.379 décès (WHO, 2016). Pour faire face au problème, le Burkina Faso a souscrit à plusieurs initiatives mondiales comme l'initiative « Faire reculer le Paludisme » pour lutter contre la maladie. A cet effet, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre dont les plus importantes sont: (i) l'adoption en 2005 des Combinaisons Thérapeutiques à base de dérivés d'Artémisinine (CTA) comme traitements de première ligne, (ii) l'adoption du Traitement Préventif Intermittent (TPI) à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) chez la femme enceinte, (iii) la Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3-59 mois et, (iv) les grandes campagnes de distribution de Moustiquaires Imprégnées d'insecticides à Longue Durée d'Action (MILDA) réalisées en 2010, 2013 et plus récemment en 2016 (MS, 2006a, MS, 2006b).

Après l'adoption des combinaisons Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artéméther-Luméfantine (AL) comme traitements de première ligne, plusieurs essais cliniques ont montré que ces médicaments sont efficaces et bien tolérés (Zongo *et al.*, 2007a; Zongo *et al.*, 2007b, Kobbe *et al.*, 2008). Cependant, les conditions dans lesquelles ces études ont été conduites (supervision des prises, strict respect des exigences du fabricant) ne reflètent pas les

conditions réelles d'utilisation de ces médicaments sur le terrain. Ainsi, notre principale hypothèse de travail était que l'efficacité rapportée dans ces essais cliniques classiques pourrait différer de celle des conditions réelles d'utilisation sur le terrain. En effet, une étude conduite chez les enfants de moins de cinq ans dans la zone de Nanoro par Tinto *et al.*, a montré une baisse d'efficacité quand les prises du médicament n'étaient pas supervisées (Tinto *et al.*, 2014b).

Aussi, sur le plan génétique, *P. falciparum* est une espèce extrêmement polymorphe. Il existe une grande diversité de souches parasitaires qui infestent les individus vivant en zone d'endémie (Lord *et al.*, 1999). Cette diversité génétique et la variation antigénique du parasite sont les deux principaux facteurs responsables de l'acquisition lente (plusieurs années) d'une protection immunitaire (prémunition) contre le paludisme. Ainsi, les individus doivent rencontrer l'ensemble du répertoire des souches de *Plasmodium* présentes dans la région avant de développer une protection efficace (Jeffery, 1966, Yazdani *et al.*, 2006).

Parallèlement, le paludisme présente des formes clinico-biologiques très variables. Cette variabilité des symptômes constitue un défi pour le diagnostic clinique qui reste encore de nos jours une pratique courante du fait des fréquentes ruptures de stocks des Tests de Diagnostic Rapide (TDR). Les manifestations cliniques résultent d'une interaction complexe entre le parasite et l'hôte humain (Marsh and Snow, 1997). En considérant les facteurs liés au parasite, l'hypothèse de souches plus virulentes que d'autres a été évoquée (Gupta *et al.*, 1994). En effet, les espèces parasitaires du paludisme des rongeurs présentent des différences notables de virulence et de pathogénicité d'une souche à l'autre, mais le recours à ces paramètres pour distinguer les souches et les isoler a toujours été limité dans le cas des plasmodies parasitant les hommes pour des raisons d'éthique. Pour ce faire, nous avons estimé (hypothèse 2) que certaines souches pourraient être associées à la sévérité de certains signes particuliers de la maladie.

Enfin, *P. falciparum* est l'espèce la plus concernée par la chimiorésistance. Récemment, des cas de résistance du parasite aux dérivés d'Artémisinine ont été signalés en Asie du Sud-Est et une baisse de sensibilité a été rapportée dans certains pays africains (Noedl *et al.*, 2009, Borrmann *et al.*, 2011). Les mutations au niveau du marqueur Kelch 13-propeller

sont associées à la résistance *in vivo* et *in vitro* aux dérivés d'Artémisinine mais son génotypage en surveillance de routine est laborieux pour la plupart des pays de l'Afrique Sub-saharienne (Ariey *et al.*, 2014). La recherche d'un marqueur moléculaire valide et efficient associé à la résistance aux CTA reste une préoccupation scientifique majeure car il constituerait l'outil par excellence de surveillance en routine de l'émergence et l'expansion de la résistance. Il a été rapporté que des mutations ponctuelles au niveau des gènes *Pfprt* (codon76) et *Pfmdr1* sont associés à la résistance à la Chloroquine et à l'Amodiaquine respectivement (Djimé *et al.*, 2001, Ursing *et al.*, 2006). Les CTA résultent d'une combinaison entre deux médicaments (un dérivé de l'Artémisinine et un médicament associé) et par conséquent une résistance pourrait survenir suite à une sensibilité réduite du médicament associé. Etant donné que les amino-quinoléines ou leurs homologues structurales font partie intégrante de ces CTA, nous avons émis l'hypothèse 3 de notre travail qui était que les marqueurs moléculaires associés à la résistance aux amino-quinoléines (mutations au niveau des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1*) pourraient être impliqués dans le mécanisme de résistance de *P. falciparum* aux CTA.

C'est au regard de tous ces aspects que nous avons conduit cette étude pour évaluer la chimio-sensibilité de *P. falciparum* aux deux CTA adoptées par le Burkina Faso et l'impact de son polymorphisme génétique sur la diversité et la sévérité des signes du paludisme.

II. Objectifs de la thèse

Objectif général: Evaluer la réponse de *P. falciparum* aux traitements antipaludiques de première intention et le rôle du polymorphisme de ce parasite dans la sévérité des formes clinico-biologiques du paludisme au Burkina Faso.

Objectifs spécifiques:

- Déterminer l'efficacité et la tolérance d'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) comparée à Artéméter-Luméfantine (AL) dans les conditions réelles d'utilisation;
- Etablir la relation entre les familles alléliques des gènes *msh1* et *msh2* de *P. falciparum* et la sévérité des formes cliniques du paludisme

- Mesurer l'association entre la fréquence des allèles des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* et la réponse au traitement avec ASAQ *et al.*

III. Organisation de la thèse

Cette thèse comprend 6 chapitres. Le **chapitre 1** intitulé «introduction générale, objectifs et organisation de la thèse» présente la problématique, les objectifs et les grandes étapes de la réalisation de cette thèse. Le **chapitre 2** présente une revue de la littérature sur le paludisme, le polymorphisme et la chimiorésistance du parasite. Le **chapitre 3** présente les résultats de l'étude d'efficacité et de tolérance des deux traitements de première intention au Burkina Faso (Artésunate-Amodiaquine et Artéméther-Luméfantrine) dans les conditions réelles de leur utilisation sur le terrain. Le **chapitre 4** présente les résultats de l'étude de la relation entre la diversité génétique de *P. falciparum* et la symptomatologie du paludisme. Le **chapitre 5** présente les résultats de l'étude de la relation entre la présence des allèles des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* et la réponse au traitement avec les deux médicaments. Enfin, le **chapitre 6** contient la discussion générale dans laquelle nous présentons l'intérêt et les implications de notre travail en santé publique.

Chapitre 2: Revue de la littérature sur le paludisme, le polymorphisme génétique et la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*

I. Généralités sur le paludisme

1. Définition

Le paludisme est une maladie infectieuse à transmission vectorielle et potentiellement mortelle, causée par des protozoaires parasites du genre *Plasmodium*. Ces parasites sont couramment transmis à l'homme par la piqûre de moustiques femelles appartenant au genre *Anopheles*. Le nom «paludisme» dérive du mot «palud» qui signifie marais car on pensait à l'origine que cette maladie provenait des zones marécageuses. C'est en 1880 à Constantine que Charles Louis Alphonse Laveran a découvert la véritable cause de la maladie qui était un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*, de la famille des *Plasmodiidae*, du phylum des *Apicomplexa* (Cox, 2010).

2. Taxonomie, morphologie et biologie du parasite

2.1 Taxonomie

L'agent pathogène de cette érythrocytopathie est un eucaryote unicellulaire. Selon le système international de classification des êtres vivants en Taxon (Systématique) les plasmodiums sont classés comme suit:

Phylum : *Apicomplexa*

Classe : *Sporozoea*

Ordre : *Haemosporida*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre: *Plasmodium*

Les espèces du genre *Plasmodium* sont regroupées en 9 sous-genres dont 3 sous-genres parasites des mammifères (*Plasmodium* (P.), *Vinckeia* (V.) et *Laverania* (L.)) (Garnham, 1964). Pour le cas du paludisme humain, on distingue les espèces suivantes: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* (renfermant les sous-espèces *P. o. curtisi* et *P. o. wallikeri*) (Oguike *et al.*, 2011) (Plasmodies humains) et *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* (Plasmodies des macaques pouvant parasiter l'homme) (Singh *et al.*, 2004), (Ta *et al.*, 2014).

2.2 Morphologie des parasites et de l'hématie parasitée

Le phylum des *Apicomplexa* regroupent un ensemble d'organismes unicellulaires caractérisés par l'existence d'une phase de sporogonie dans leur cycle évolutif ainsi que par la présence d'un complexe apical. La sporogonie est un mode de multiplication asexuée aboutissant à la formation de sporozoïtes à partir d'un zygote diploïde par une succession de méioses. Le complexe apical regroupe un ensemble d'organites spécialisés que sont: rhoptries, micronèmes et granules denses (Bannister *et al.*, 2000). La figure 1 illustre l'ultrastructure du complexe apical au niveau du mérozoïte:

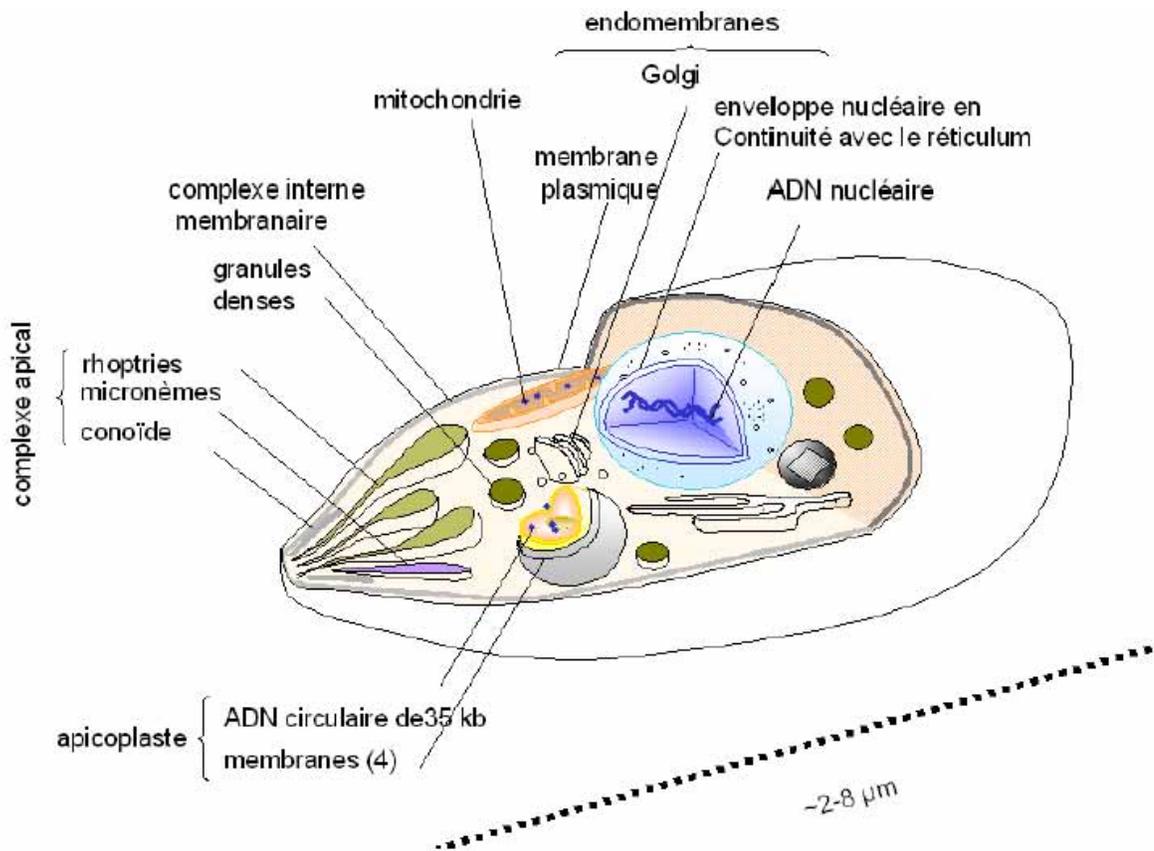


Figure 1: Ultrastructure du complexe apical au niveau du mérozoïte
 (<http://patentimages.storage.googleapis.com> site consulté le 07/11/2016)

L'espèce *P. falciparum* est reconnaissable à travers les caractéristiques suivantes: hématie parasitée de taille normale, piquetée de tâches de Maurer, trophozoïtes jeunes de 1,5 à 2 microns de diamètre, formés d'un anneau cytoplasmique entourant une vacuole et d'un ou de deux noyaux, le polyparasitisme des hématies très fréquent. Les gamétocytes sont en forme de croissant, mesurant 8 à 14 microns. Le noyau, disséminé dans le cytoplasme bleu ou rosé est souvent masqué par un pigment comme l'indique la figure 2 ci-dessous :

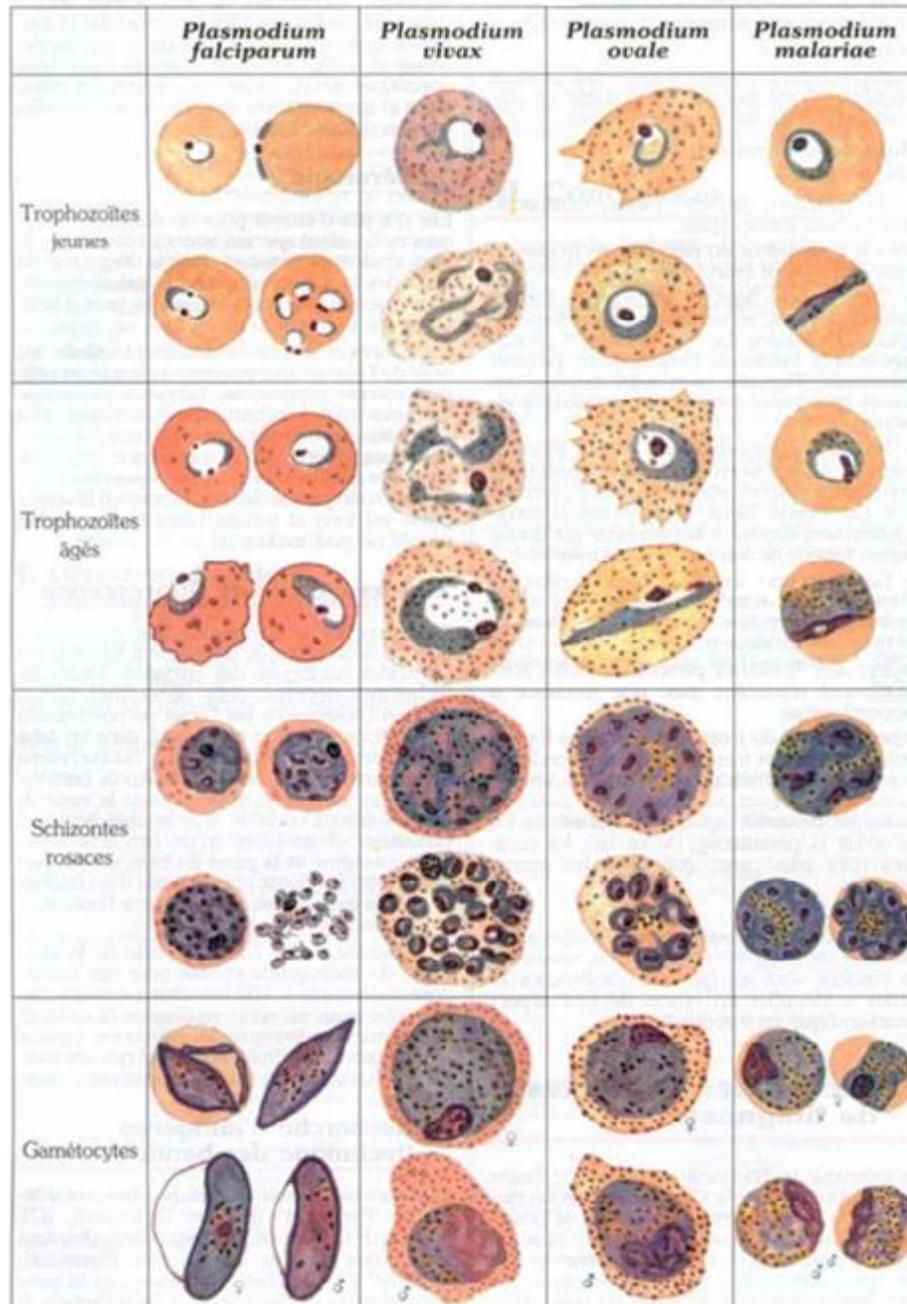


Figure 2 : Morphologie des différents stades sanguins par espèce (www.ledamed.org consulté le 12/01/2017)

. Les formes invasives pour l'homme sont les sporozoïtes, les mérozoïtes et l'ookinète; les autres (trophozoïtes, schizontes et gamétocytes) étant des formes de croissance. Ce parasite en

l'absence de ré-infestation, disparaît en quelques mois car il n'y a pas d'hypnozoïtes (Bannister *et al.*, 2000).

2.3. Nutrition

Un parasite est un être vivant qui pendant une partie ou la totalité de son existence vit en se nourrissant aux dépens d'un autre organisme (d'une autre espèce) appelé hôte. Ce mode de vie (parasitisme) est obligatoire pour les plasmodies qui vivent et se nourrissent aux dépens de l'homme (plasmodies humaines) ou de l'anophèle. Chez l'homme, ils se reproduisent de façon asexuée par schizogonie à l'intérieur des hématies et des hépatocytes et satisfont partiellement à leurs besoins nutritionnels en ingérant l'hémoglobine par son cytosome puis en le protéolysant dans sa vacuole acide afin d'obtenir les acides aminés nécessaires à sa synthèse protéique. Cette dégradation de l'hémoglobine libère l'hème qui, sous sa forme soluble (ferriprotoporphyrine), est toxique pour le parasite. De ce fait, le parasite le concentre sous une autre forme non toxique en granules brun foncé appelés hémozoïne qui est un polymère constitué de monomères d'hème (Francis *et al.*, 1997). Pour la synthèse de son ADN, le parasite utilise les bases puriques de son hôte en convertissant l'hypoxanthine érythrocytaire en inosine monophosphate puis en guanine et adénosine. Il synthétise de *novo* les bases pyrimidiques (Belen Cassera *et al.*, 2011).

3. Cycle de développement du parasite

Le cycle biologique du *Plasmodium* passe par deux (02) hôtes: un hôte intermédiaire (l'homme), chez qui se déroule la multiplication asexuée et un hôte définitif (l'anophèle femelle) où a lieu la reproduction sexuée.

- Phase sexuée chez le moustique: Le sang, ingéré par l'anophèle femelle lors du repas sanguin pris sur un sujet infesté par le *Plasmodium*, contient des trophozoïtes, des schizontes et des gamétocytes mâles et femelles du parasite. Seuls les gamétocytes sont invasifs pour le moustique et seront donc les seuls à continuer leur croissance. Dans l'estomac de l'insecte, les gamétocytes subissent une différenciation en gamètes. Chaque gamétocyte femelle s'arrondit et devient un gamète femelle ou macrogamète. Les gamétocytes mâles subissent une exflagellation et donnent chacun huit (08) gamètes mobiles ou microgamètes. La fécondation a

lieu dans l'estomac, puis l'œuf ainsi formé, ou ookinète (diploïde) mobile traverse la paroi gastrique et se fixe sur la face externe, bombant dans la cavité cœlomique. Après une étape de méiose, il devient alors un oocyste immobile et arrondi. Lors de ce passage de la diploïdie à l'haploïdie, des «crossing-over» se produisent entre chromosomes homologues appariés, entraînant l'émergence de nouveaux phénotypes. L'oocyste, en se divisant à l'intérieur de sa «coque» donne un grand nombre de sporozoïtes mobiles qui gagnent activement les glandes salivaires à travers la cavité générale; ce sont les formes infestantes (sporozoïtes), prêtes à être injectées à l'homme lors d'une prochaine piqûre (Robert and Boudin, 2003).

- Phase asexuée chez l'homme: Les sporozoïtes inoculés dans le sang capillaire par l'anophèle femelle (l'injection de salive est indispensable pour empêcher la coagulation du sang) quittent rapidement la circulation pour pénétrer dans les hépatocytes. Le sporozoïte porte la protéine circum-sporozoitaire (CSP) impliquée dans l'infectivité et l'invasion de l'hépatocyte. A ce stade, les sporozoïtes subissent des modifications morphologiques en perdant leur complexe apical puis s'arrondissent, devenant ainsi des cryptozoïtes. Ces derniers augmentent de taille tandis que leurs noyaux se multiplient; il se forme ainsi des schizontes hépatocytaires contenant 10000 à 30000 noyaux; ce sont les futurs mérozoïtes. L'hépatocyte éclate et libère les mérozoïtes qui passent dans la circulation. Cette phase hépatocytaire dure entre 6 et 9 jours chez *P. falciparum*. Chez certaines espèces, certains cryptozoïtes restent quiescents (hypnozoïtes) pendant longtemps avant de démarrer leur multiplication entraînant ainsi des rechutes à distance de la période d'infestation initiale. C'est le cas de *P. ovale* et *P. vivax* (Prudêncio *et al.*, 2006).

Recouverts d'antigènes de surface, les mérozoïtes vont pénétrer à l'intérieur des hématies suivant une séquence précise. Des récepteurs de membrane protéiques ou glycoprotéines de l'érythrocyte sont reconnus par le mérozoïte, lui permettant de se fixer à la surface de la membrane érythrocytaire (Cowman and Crabb, 2006). La membrane du globule rouge s'invagine, entraînant avec elle le parasite. Le mérozoïte se retrouve alors dans la cavité érythrocytaire dans une pseudo-vacuole et induit durant sa croissance, des altérations de la paroi érythrocytaire. Ainsi, l'invasion de l'érythrocyte peut être subdivisée en plusieurs phases: (i) fixation initiale ou attachement, (ii) réorientation apicale, (iii) formation de la jonction apicale, (iv) formation de la vacuole, (v) pénétration du mérozoïte à l'intérieur de la

vacuole et (vi) obturation de l'orifice de la vacuole (Rowe *et al.*, 2009). Ce processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte est représenté dans la figure 3 ci-dessous:

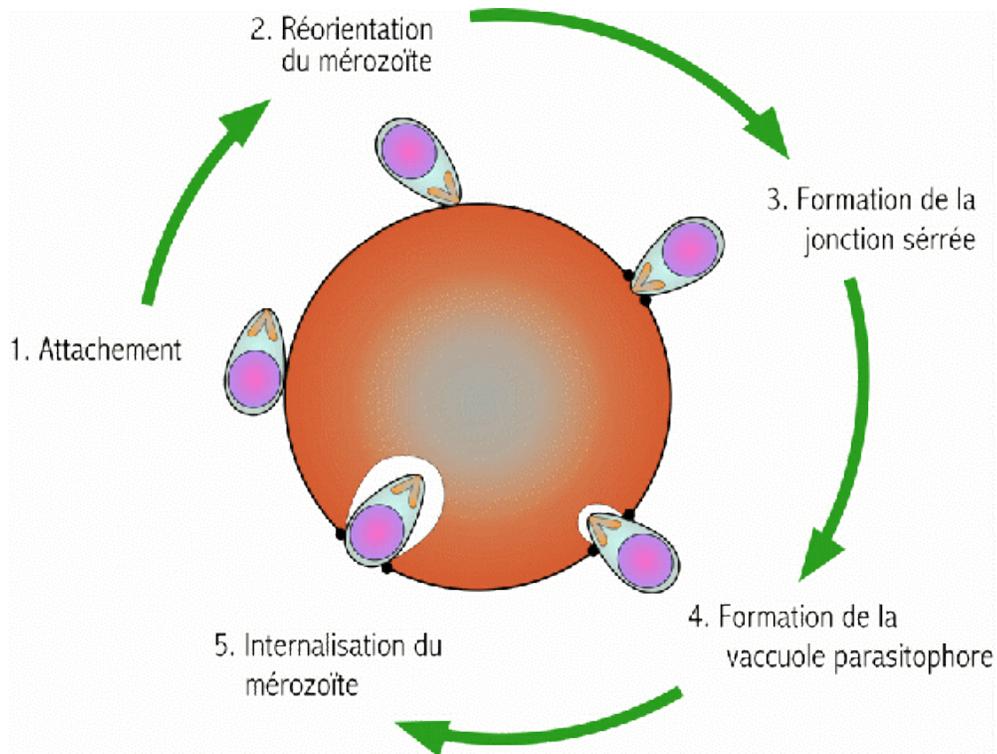


Figure 3: Mécanisme d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte

<http://ebischoff.free.fr/Palu/palu2.html> (consulté le 14/07/2016)

Grâce à la dégradation de l'hémoglobine, le parasite augmente de taille puis se multiplie jusqu'à former un schizonte mûr qui provoque l'éclatement de l'hématie et la libération des mérozoïtes qui vont parasiter d'autres hématies (Cowman and Crabb, 2006). La phase endo-érythrocytaire dure environ 48 heures chez *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* alors qu'elle dure environ 72 heures chez *P. malariae* et environ 24 heures chez *P. knowlesi* (Garcia *et al.*, 2001). A ce stade, le parasite (*P. falciparum*) exprime une protéine qui est présentée à la surface de l'érythrocyte. Il s'agit du PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) qui confère aux cellules infestées les propriétés de cyto-adhérence et de séquestration dans les microvaisseaux, observées au cours du paludisme grave et l'infection placentaire (Pouvelle *et al.*, 2000). La gamétocytogenèse découle des schizogonies successives et certains trophozoïtes dont les noyaux ne se sont pas divisés se

transforment en gamétocytes (Inselburg, 1983). Ces formes parasitaires permettront l'infestation de l'anophèle femelle et un nouveau cycle recommence. La figure 4 présente le schéma du cycle biologique du parasite:

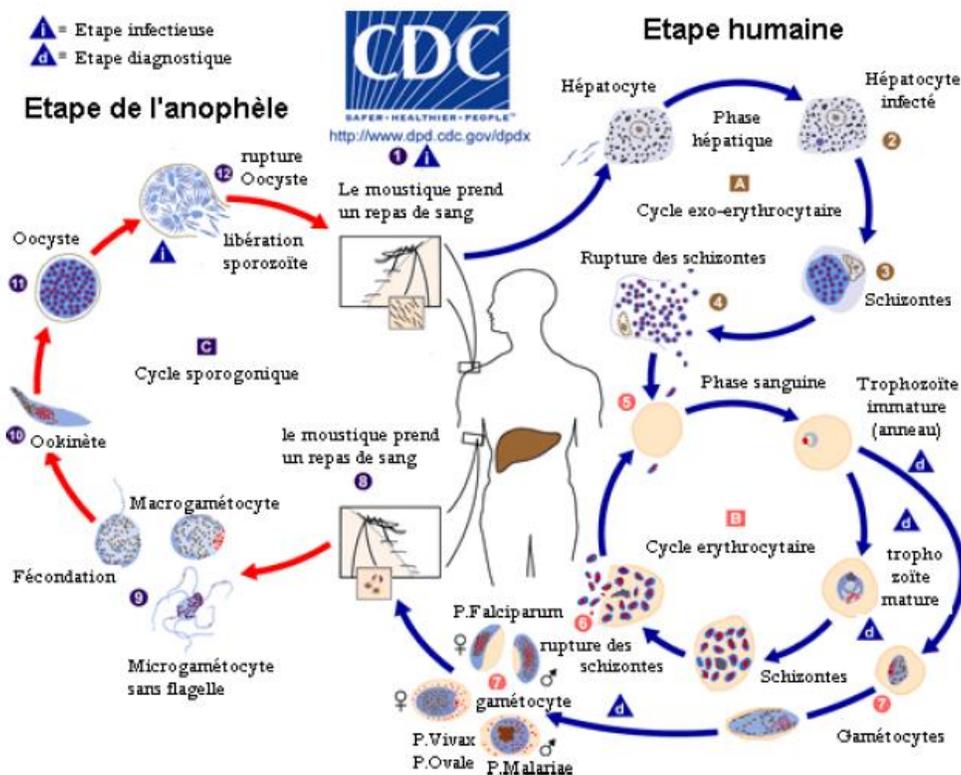


Figure 4: Cycle biologique des plasmodies

(http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/malaria_LifeCycle.GIF)

4. Taxonomie et Biologie du vecteur

Les anophèles femelles sont les vecteurs du paludisme et transmettent les formes infestantes du *Plasmodium* (sporozoïtes) à l'homme. En règle générale de systématique, les anophèles peuvent être classés comme suit:

Règne: AnimalPhylum: Arthropodes (pattes articulées)

Classe: Insectes (corps segmenté en trois parties)

Sous- Classe: Ptérygotes (avec des ailes)

Ordre: Diptères (avec deux ailes)

Sous-Ordre: Nématocères (avec antennes rondes et longues)

Famille: Culicidés (moustiques)

Sous-famille: Anophélinés

Genre: *Anopheles*

Il existe 484 espèces d'anophèles dont une soixantaine est vectrice de *Plasmodium* humains (Harbach, 2004). En Afrique, les deux principaux complexes d'espèces vectrices sont: *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Le complexe *An. gambiae* comprend les espèces suivantes: *An. gambiae* Giles (ancienne forme S), *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson (ancienne forme M), *An. arabiensis*, *An. bwambae*, *An. merus*, *An. melas*, *An. quadriannulatus* (Afrique de l'Ouest), *An. amharicus* (Ethiopie) (Coetzee *et al.*, 2013).

Il s'agit d'insectes à métamorphose complète (holométabole) de sorte que l'adulte, la larve et la nymphe ont des morphologies très différentes. La ponte se fait isolement en vol, dans les surfaces des eaux claires, dormantes et ensoleillées. L'œuf est de forme allongée d'environ ½ millimètre de longueur. La larve d'anophèle se distingue par l'absence de pattes, un thorax relativement gros et sa position parallèle à la surface de l'eau au repos. Le dernier stade larvaire (stade IV) mesure environ 12-15 millimètres. La nymphe se caractérise par la coalescence de la tête et du thorax, sa mobilité, une respiration aérienne et ne s'alimente pas. Un dimorphisme sexuel est observé à ce stade avec les nymphes mâles plus petites que les nymphes femelles. L'adulte ou imago possède aussi des caractéristiques particulières. Morphologiquement, l'insecte femelle est reconnaissable à sa façon de se fixer sur un support au repos (corps oblique par rapport au support). On note l'existence de trois parties bien distinctes: la tête, le thorax et l'abdomen. Seule l'anophèle femelle, grâce à l'appareil piqueur de sa trompe peut transmettre le *Plasmodium*. Les anophèles piquent généralement entre le crépuscule et le petit matin. L'hématophagie est nécessaire à la femelle car certains éléments (vitamines, acides aminés) contenus dans le sang sont indispensables à la maturation des œufs

après la fécondation de l'insecte femelle. Le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés et n'est pas hématophage (Carnevale *et al.*, 2009).

5. Cycle de développement des anophèles

- La figure 5 ci-dessous représente le cycle évolutif du vecteur. Le cycle de développement des anophèles comprend quatre stades successifs: œuf, larve, nymphe (stades aquatiques) et imago (stade aérien) (Carnevale *et al.*, 2009).

- La phase aquatique: au cours de cette phase se développent les stades immatures ou pré-imago que sont: œuf, larve et nymphe. On distingue quatre stades larvaires entrecoupés chacun d'une mue caractérisée par un accroissement morphologique. De façon générale, le développement des stades aquatiques se fait dans des eaux relativement propres. La durée de cette phase aquatique est de 1 à 3 semaines en zone tropicale (Carnevale *et al.*, 2009).

- La phase aérienne: l'accouplement se fait peu après l'éclosion avant ou après le premier repas sanguin. Généralement, une seule insémination est réalisée au cours de la vie de chaque femelle. On appelle cycle gonotrophique, la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs. Cela comprend: (i) la recherche de l'hôte par la femelle à jeun pour le repas sanguin, (ii) l'ingestion et la digestion du sang accompagnée de la maturation des follicules ovariens, (iii) la recherche du lieu de ponte par la femelle gravide. La durée de vie de l'insecte adulte est d'environ 3-4 semaines (Carnevale *et al.*, 2009).

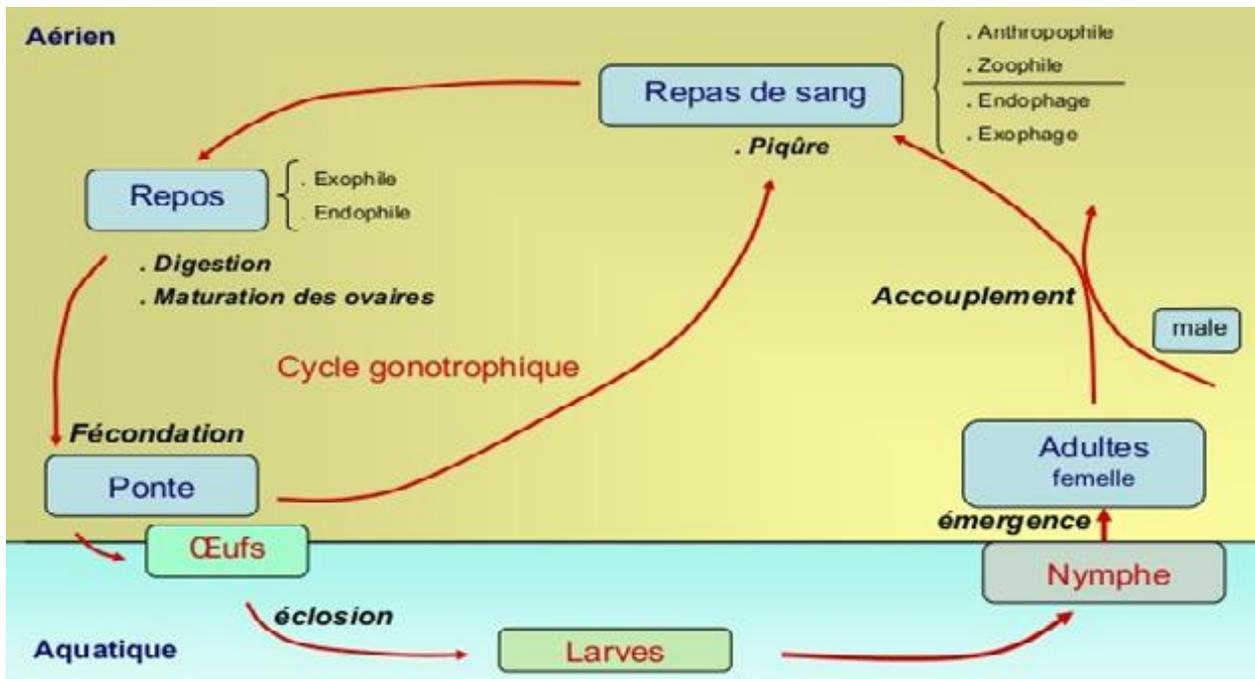


Figure 5: Cycle évolutif du moustique (<http://www.fr.slideshare.net>, consulté le 06/11/2016)

6. La transmission du paludisme

En 1897, Ronald Ross montra pour la première fois le rôle du moustique dans la transmission du paludisme mais ses travaux réalisés en Sierra Léone ne concernaient que les cas aviaires. C'est l'italien Giovanni Battista Grassi qui montrera en 1898 que le vecteur du paludisme humain était également un moustique du genre *Anopheles* (Cox, 2010). Outre le mode de transmission principal par la piqûre du moustique, il existe d'autres modes de transmission: la transmission par voie placentaire, la transmission par transfusion sanguine.

La transmission dépend également des conditions climatiques qui peuvent influencer sur l'abondance et la survie des moustiques, tels que le régime des précipitations, la température et l'humidité. Dans les zones tropicales et subtropicales, ainsi que dans les régions de climat méditerranéen, la saison sèche ou hivernale s'accompagne d'une diminution notable des anophèles, donc d'un arrêt de la transmission. Par contre, la saison des pluies permet la pullulation des anophèles et la transmission de l'hématozoaire, qui sera donc saisonnière. La transmission débute quelques semaines après le début de la saison des pluies, qui est le temps nécessaire à la maturation des vecteurs, puis se poursuit durant toute la saison humide et se

prolonge quelques semaines après le début de la saison sèche, car les gîtes larvaires s'assèchent lentement. On parle alors de zone de transmission instable, contrairement aux zones stables où la transmission est pérenne sur toute l'année (Carnevale *et al.*, 2009).

7. Mesure de la transmission

Toute campagne de lutte contre le paludisme doit obligatoirement être précédée d'une enquête épidémiologique soigneuse afin d'estimer le niveau de transmission et apprécier les variations éventuelles suivant les saisons. Les indices paludométriques sont couramment utilisés pour estimer le niveau de transmission du paludisme. Il s'agit essentiellement de paramètres entomologiques, cliniques et parasitologiques (Blanchy *et al.*, 1993, Macdonald, 1955).

7.1. Les indices entomologiques (Carnevale *et al.*, 2009)

- **Le taux d'inoculation entomologique:** il se définit comme étant le nombre de piqûres infestantes d'anophèles qu'un sujet reçoit à une période donnée. Il est généralement calculé par nuit mais peut être évalué par mois, par saison ou par an.

- **L'indice sporozoïtique** qui représente le pourcentage de moustiques portant des sporozoïtes dans les glandes salivaires sur un nombre de moustiques disséqués. Par convention, il est aussi appelé indice circum-sporozoïtique qui représente le pourcentage de moustique testés positifs par ELISA pour la détection de l'antigène circum-sporozoïtique. Cet indice, couplé à la densité anophélienne agressive permet de connaître le nombre moyen de piqûres infestantes reçu par nuit et par personne.

- **L'indice oocystique:** il représente le pourcentage de femelles d'anophèles porteuses d'oocystes dans la paroi de l'estomac sur un nombre de moustiques disséqués.

7.2. Les indices cliniques et parasitologiques

- **L'indice plasmodique (IP)** qui est généralement estimé chez les enfants de 2 à 9 ans représente le rapport du nombre d'enfants porteurs d'hématozoaires dans le sang sur le nombre total de sujets examinés. L'indice plasmodique permet de classer les zones

impaludées comme suit: (i) zone hypo-endémique ($0 < IP \leq 19\%$), (ii) zone méso-endémique ($20\% \leq IP \leq 49\%$), (iii) zone hyper-endémique ($50\% \leq IP \leq 75\%$) et (iv) zone holo-endémique ($IP > 75\%$) (Metselaar and Van Thiel, 1959).

- **L'indice gaméocytaire:** il est généralement déterminé par groupe d'âge et représente le pourcentage de sujets présentant des gaméocytes dans le sang circulant sur l'ensemble des sujets examinés.

- **L'indice splénique:** cet indice se traduit par le rapport d'enfants porteurs de splénomégalie sur le nombre total d'enfants examinés. Il est généralement apprécié chez les enfants de moins de 10 ans et permet d'apprécier l'efficacité d'une campagne de lutte anti-palustre.

8. Les manifestations cliniques du paludisme

Après une piqûre anophélienne infestante, l'évolution schématique du paludisme comporte: une période d'incubation, une phase de primo invasion et une phase d'accès intermittents. La durée de la phase d'incubation est variable selon l'espèce plasmodiale, l'intensité et le mode d'infestation, la réceptivité et l'état immunitaire du sujet infesté. Pour *P. falciparum*, l'incubation est de 7 à 15 jours (Trampuz *et al.*, 2003). La primo-infection correspond à l'invasion du sang de l'individu par le parasite. Les manifestations cliniques du paludisme n'apparaissent qu'au cours de la multiplication asexuée des plasmodies à l'intérieur des hématies, faisant du paludisme, au sens propre, une érythrocytopathie parasitaire (Garcia *et al.*, 2001, Trampuz *et al.*, 2003). Les premiers symptômes (fièvre, maux de tête, frissons et vomissements...) sont non spécifiques et difficiles à attribuer au paludisme.

Pour le paludisme à *P. vivax* et à *P. ovale*, des rechutes cliniques peuvent se produire des semaines ou des mois après la première infection même si le patient a quitté la zone impaludée. Ces nouveaux épisodes sont dus à des hypnozoïtes, et un traitement spécial ciblant ces stades hépatiques est impératif pour guérir complètement de la maladie (Cogswell, 1992).

On distingue le paludisme simple qui, s'il n'est pas traité aussi tôt peut évoluer vers un paludisme grave, affection sévère souvent mortelle. Selon l'OMS, le paludisme simple se

définit comme étant une infestation plasmodiale sans signes de gravité ni éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux et qui peut être traitée par voie orale. Sur le plan clinique, la suspicion de paludisme repose principalement sur la présence d'un état fébrile ou d'antécédent de fièvre (WHO, 2015a).

Le paludisme à *P. falciparum* est considéré comme étant un paludisme grave s'il y a au moins un des signes suivants (WHO, 2015a):

- Sur le plan clinique : troubles de la conscience ou coma aréactif, prostration, c'est-à-dire que le malade est si faible qu'il est incapable de marcher ou de s'asseoir sans assistance, incapacité à s'alimenter, convulsions multiples (plus de deux épisodes par 24 heures), respiration profonde, détresse respiratoire (respiration acidotique), collapsus cardiovasculaire ou état de choc, tension artérielle systolique <70 mm Hg chez l'adulte et <50 mm Hg chez l'enfant, ictère clinique accompagné d'autres signes de dysfonctionnement des organes vitaux, hémoglobinurie, saignements spontanés anormaux, œdème pulmonaire (radiologique) (WHO, 2015a).

- Sur le plan biologique: hypoglycémie (glycémie <2,2 mmol/l ou < 40 mg/dl), acidose métabolique (bicarbonate plasmatique <15mmol/l), anémie normocytaire sévère (Hb<5g/dl, hématocrite <15%), hyper-parasitémie (>2% ou >100000/μL en zone de faible transmission ou >5% ou >250 000 /μl en zone de transmission forte et stable), hyper-lactacidémie (acide lactique >5 mmol/l), insuffisance rénale aiguë (créatinine sérique > 265 μmol/L) (WHO, 2015a).

9. Immunité anti-plasmodiale: notion de prémunition

L'immunité naturelle se définit comme étant un état réfractaire d'un sujet humain vis-à-vis du *Plasmodium*. L'homme est immunisé contre les parasites des rongeurs (*P. berghei*) mais cette protection est inefficace dans le cas des *Plasmodium* humains. Ainsi, après plusieurs années d'infections répétées, les sujets vivant en zone d'endémie peuvent acquérir une immunité, appelée prémunition (symptômes atténués d'une maladie qui protège contre une infection ultérieure de type sévère). Il s'agit donc d'un état immunitaire conférant une

protection relative acquise progressivement (2-10 ans), provoqué et entretenu par la présence du parasite dans l'organisme de l'hôte (Marsh and Kinyanjui, 2006, Gupta *et al.*, 1999). Cette immunité s'estompe après le départ de la zone d'endémie, peu après la disparition des parasites dans l'organisme. La figure 6 représente la variation du risque d'infestation plasmodiale en fonction de l'âge montrant l'effet de la prémunition chez les sujets âgés vivant en zone d'endémie.

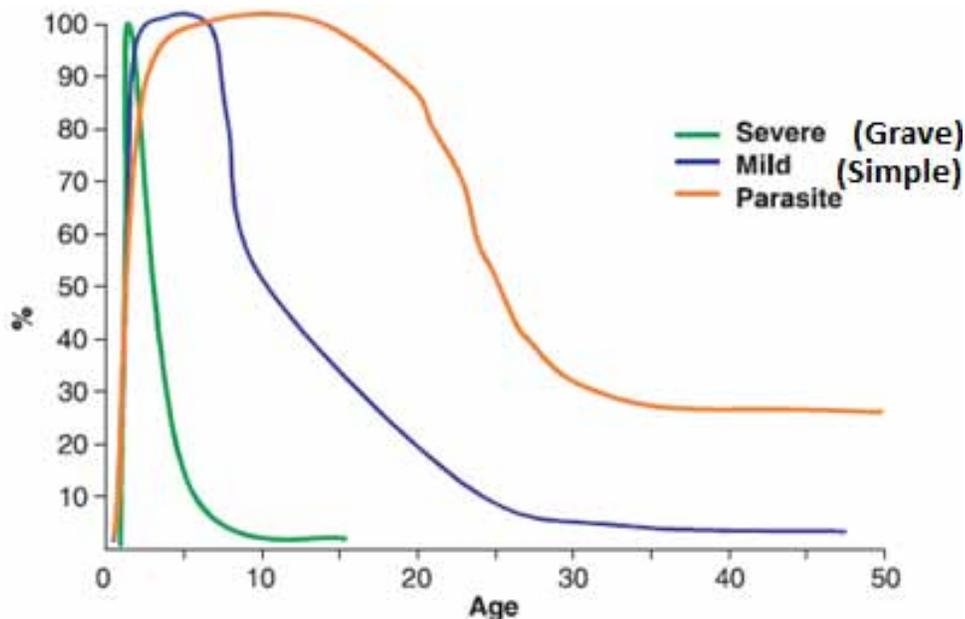


Figure 6: Variation du risque d'infection pour les individus vivant en zone d'endémie (Marsh and Kinyanjui, 2006)

10. Diagnostic du paludisme

Une prise en charge efficace de la maladie requiert qu'un bon diagnostic soit posé sans délai. Le diagnostic repose sur la suspicion clinique d'un paludisme et la confirmation par un examen biologique de détection directe des plasmodies ou indirectement par la détection d'un indicateur de leur présence dans le sang (Makler *et al.*, 1998, WHO, 2015a).

10.1. Les éléments d'orientation

- Les éléments d'orientation cliniques: la symptomatologie du paludisme n'est pas spécifique. En zone d'endémie, la suspicion clinique est basée sur une notion de fièvre au

cours des dernières 24 heures ou sur la présence d'une anémie, pour laquelle une pâleur palmaire semble être le signe le plus fiable chez le jeune enfant. Dans une zone de faible transmission, elle est basée sur la notion de fièvre au cours des trois jours précédents sans autres signes de maladie grave (Chandramohan *et al.*, 2001, WHO, 2015a).

- Les éléments d'orientation biologiques: les paramètres suivants peuvent amener à penser à une infection palustre. Il s'agit essentiellement de: anémie hémolytique, hyperleucocytose initiale suivie d'une leuco-neutropénie au cours des accès répétés, une thrombopénie (10000 plaquettes/mm³) et les différentes perturbations biochimiques (cytolyse modérée, hypo-albuminémie, hypo-cholestérolémie, hypo-calcémie, hypertriglycémie). Dans tous les cas, toute suspicion de paludisme basée sur des signes cliniques ou les autres éléments d'orientation devrait être confirmée par un diagnostic beaucoup plus fiable (WHO, 2015a).

10.2. Diagnostic parasitologique direct

C'est le diagnostic de certitude car il consiste à la mise en évidence des parasites dans les globules rouges.

- L'examen microscopique des gouttes épaisses et frottis minces: les lames sont couramment colorées au Giemsa mais d'autres colorants comme le Field peuvent être utilisés (Barcia, 2007). Il demeure la méthode de référence en termes de sensibilité et de spécificité. Il permet de confirmer la maladie, d'identifier l'espèce plasmodiale en cause et permet un contrôle de l'efficacité du traitement antipaludique par le suivi de la parasitémie. Cependant, ses performances en termes de sensibilité et de fiabilité dépendent directement de l'expérience du microscopiste et du niveau de la parasitémie du sujet infesté (Makler *et al.*, 1998, Siala *et al.*, 2010).

- Le QBC Malaria test ou Quantitative Buffy Coat: le principe de cette technique microscopique de fluorescence repose sur l'utilisation d'un fluorochrome (l'acridine orange) capable de se fixer sur le noyau du parasite. Le sang est prélevé dans des tubes QBC (tapissés d'acridine orange) puis centrifugé. La sédimentation des constituants se fait selon le gradient entraînant la formation de plusieurs couches successives représentant respectivement les

plaquettes, les globules blancs, les globules rouges parasités et enfin les globules rouges non parasités. L'observation de la couche intermédiaire au microscope en UV permet de détecter facilement les globules parasités colorés à l'acridine orange. Malheureusement, son emploi nécessite un matériel et des réactifs coûteux, ce qui limite son utilisation. Il ne permet pas non plus le diagnostic d'espèce et le calcul de la parasitémie (Baird and Jones, 1992, Makler *et al.*, 1998).

10.3. Le diagnostic immunologique

- La détection d'antigènes du parasite par les tests de diagnostic rapides (TDR): ils reposent sur le principe de l'immuno-chromatographie en utilisant des bandelettes sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux (Tjitra *et al.*, 1999). Les antigènes détectés sont: «Histidin Rich Protein» 2 (HRP-2), une glycoprotéine spécifique de *P. falciparum*, le *Plasmodium* Lactase déshydrogénase (pLDH) qui est une enzyme glycolytique (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) et l'aldolase (*P. falciparum* et *P. vivax*). Des anticorps monoclonaux dirigés contre ces enzymes sont préfixés à la membrane de nitrocellulose. Les antigènes du parasite (contenus dans le sang du malade), une fois en contact avec ces anticorps monoclonaux sont détectables (apparition d'un trait sur la bandelette) grâce à l'action d'un deuxième anticorps révélateur (Tjitra *et al.*, 1999, Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Au Burkina Faso, le kit Pf HRP-2 est utilisé dans les formations sanitaires pour le diagnostic du paludisme.

- La détection des anticorps antiplasmodiaux: en zone d'endémie, la sérologie n'a pas de place dans le diagnostic du paludisme en raison de l'apparition tardive des anticorps (Ac) par rapport à l'émergence des parasites dans le sang. Le diagnostic sérologique se heurte 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 2 à 3 ans après l'infection (Siala *et al.*, 2010). Cependant, la sérologie a un intérêt épidémiologique car elle permet d'évaluer le niveau d'endémicité et le suivi de l'efficacité d'un programme de lutte. La technique ELISA et l'Immunofluorescence indirect (IFI) sont les plus couramment utilisées (Makler *et al.*, 1998, Siala *et al.*, 2010).

10.4. Le diagnostic moléculaire

La détection des acides nucléiques par les techniques d'amplification génique est la technique la plus sensible. Elle permet de détecter de très faibles parasitémies dans le sang avec une possibilité de quantification de l'ADN plasmodial en utilisant la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR). Plusieurs techniques de PCR sont actuellement disponibles pour le diagnostic. On peut citer entre autre la PCR conventionnelle, la PCR nichée, la PCR multiplex, la PCR à temps réel, le «Direct Blood PCR», etc (Siala *et al.*, 2010, Mens *et al.*, 2012). Les cibles d'amplifications sont également diverses mais les plus couramment utilisés sont entre autre le gène de la grande sous-unité de l'ARN ribosomal (conservées chez toutes les espèces), celui de la petite sous-unité 18s de l'ARN ribosomal, le gène du circumsporozoïte, etc. Outre le diagnostic, la PCR est orientée pour le suivi de l'efficacité thérapeutique des traitements (distinction des recrudescences des nouvelles infections), la surveillance des marqueurs moléculaires etc.

11. Traitement du paludisme

11.1. Les molécules antipaludiques

Une gamme variée de médicaments est disponible pour lutter contre le paludisme. En fonction de leur mode d'action, ils peuvent être classés comme suit (DA, 2003, Foley and Tilley, 1998):

➤ Les Schizontocides:

- Les schizontocides électifs qui comprennent d'une part les quinoléines et dérivés (Chloroquine [(diéthylamino-4'-methyl-butylamino)-4-chloro-7-quinoleine C₁₈H₂₆ClN], Amodiaquine, Quinine, Méfloquine, Luméfantrine) et d'autre part l'Artémisinine et ses dérivés (Arthéméter, Artésunate, Dihydroartémisinine). Ces antipaludiques agissent contre les stades schizontes par accumulation dans la vacuole digestive du parasite.
- Les inhibiteurs d'acides nucléiques: On y distingue les antifolates qui comprennent les antifoliques (sulfamides dont la Sulfadoxine) qui inhibent la dihydroptéroate syntéthase (*dhps*)

et les antifoliniques (Pyriméthamine, Proguanil) qui inhibent la synthèse de l'acide folinique en agissant sur la dihydrofolate reductase (*dhfr*).

- Les naphthoquinones (Atovaquone) sont des inhibiteurs d'acides nucléiques qui agissent sur la chaîne de transfert d'électron au niveau de la mitochondrie en inhibant la dihydroorotate déshydrogénase (DHODase).

- Certains antibiotiques en particulier les tétracyclines (Doxycycline) et macrolides (Azythromycine, Erythromycine...) sont des inhibiteurs protéiques en agissant au niveau de l'apicoplaste.

➤ Les Gamétocytocides

Ils constituent un groupe d'antipaludiques actifs sur les formes sexués du parasite. C'est le cas des amino-8-quinoléine telle que la Primaquine et la Tafénoquine (Shanks *et al.*, 2001).

11.2. Schéma thérapeutique

En cas de paludisme simple, l'objectif du traitement est de guérir l'infestation le plus rapidement possible. Cela permet de prévenir la progression vers une forme grave et d'éviter une morbidité résultant d'un échec thérapeutique.

Les CTA sont actuellement les traitements recommandés. La combinaison de traitement consiste à mettre à profit l'association synergique ou additive de deux médicaments ou d'avantage afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et de retarder l'apparition d'une résistance à chacun des constituants de cette association. Les combinaisons suivantes sont recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum*: Artéméter-Luméfántrine (AL), Artésunate- Amodiaquine (ASAQ), Artésunate-Méfloquine (ASMQ), Artésunate-Sulfadoxine-Pyriméthamine (ASSP), Dihydroartémisinine-Pipéraquine, (WHO, 2001). Au Burkina Faso, ce sont les combinaisons ASAQ *et al* qui ont été recommandées par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* (MS, 2006b).

Pour le paludisme grave, le principal objectif est d'éviter une issue fatale, les objectifs secondaires étant la prévention des séquelles ou d'une recrudescence. L'Artésunate en intraveineuse ou en intramusculaire est le traitement recommandé. L'Artéméter ou la

Quinine sont des alternatives possibles si l'on ne dispose pas de l'Artésunate injectable (WHO, 2015a). Toutefois au Burkina Faso, la Quinine garde toujours une place de choix en plus de l'Artésunate injectable (MS, 2006b).

12. Prévention du paludisme

12.1 Protection contre les moustiques

La lutte anti-vectorielle reste le principal moyen de réduire la transmission du paludisme au niveau communautaire. Lorsque la couverture est suffisamment large, la lutte anti vectorielle permet de réduire ou d'interrompre efficacement la transmission de la maladie (Carnevale *et al.*, 2009).

➤ Réduction de la densité des moustiques

- **La lutte anti-larvaire:** les mesures de lutte contre les larves sont spécifiques du lieu et de l'écologie. La lutte anti-larvaire consiste à tuer les larves de moustiques avant qu'elles ne deviennent des moustiques adultes pouvant transmettre le paludisme. Elle est essentiellement basée sur le drainage, l'application de larvicides aux plans d'eau ou l'introduction d'animaux prédateurs. Les traitements larvicides ne sont donc recommandés que dans les zones où les gîtes larvaires de moustiques vecteurs du paludisme sont peu nombreux, fixes et identifiables, et où les sites sont faciles à localiser, à cartographier et à traiter (Carnevale *et al.*, 2009).

- **La lutte imagicide:** elle est basée sur la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations et par pulvérisations spatiales extra-domiciliaires. Un insecticide est une substance active ou une préparation susceptible de tuer les insectes et ou leurs larves et ou leurs œufs. Les principaux insecticides de synthèse appartiennent à cinq familles chimiques (Carnevale *et al.*, 2009):

(i) **Les organochlorés:** ce sont des insecticides de contact altérant le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux. Exemples : le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), premier insecticide de synthèse, l'Hexachlorocyclohexane (HCH), le Lindane, le Dieldrine... En plus du problème de résistance du vecteur, ces composés

sont stables et s'accumulent dans la chaîne alimentaire, justifiant l'interdiction de leur utilisation.

(ii) Les organophosphorés: ce sont des inhibiteurs de la cholinestérase. Dans ce groupe on distingue de nombreux insecticides (le Malathion, le Fénitrothion, le Parathion, le Dichlorvos, le Chlorpyrifos, le Diazinon...). Ils présentent une toxicité aiguë élevée et une faible rémanence.

(iii) Les carbamates: cette famille regroupe les dérivés de l'acide carbamique qui agissent le plus souvent par contact en inhibant la cholinestérase. Dans ce groupe on distingue le Bendiocarbe, le Carbosulfan (larvicide aussi), le Propoxur, le Carbaryl etc.

(iv) Les pyréthrinoïdes de synthèse: ce sont des insecticides de synthèse (copiés du pyrèthre naturel, extrait de plante) peu toxiques agissant par contact en bloquant la transmission de l'influx nerveux. Ils sont surtout employés en application murale ou en imprégnation des moustiquaires. Exemples: Perméthrine, Alphaméthrine, Deltaméthrine, Fenvalérate, Bifenthrine, Bioresméthrine, Cyperméthrine...

(v) Les benzyolurées: ces composés chimiques sont des régulateurs de croissance des insectes qui agissent par inhibition de la synthèse de la chitine. On les appelle des perturbateurs de mues. Les plus couramment utilisés sont: le Diflubenzuron, le Chlorfluazuron, le Flufénoxuron, l'Hexaflumuron...(Carnevale *et al.*, 2009).

➤ **La réduction du contact homme-vecteur**

- L'utilisation des moustiquaires: bien que les moustiquaires non traitées soient depuis longtemps utilisées pour se protéger des piqûres de moustiques, l'avènement des moustiquaires imprégnées d'insecticides a considérablement augmenté leur efficacité et à cela s'ajoute l'effet de la barrière physique et un effet répulsif et létal vis-à-vis des moustiques (Carnevale *et al.*, 2009).

- Les rideaux imprégnés: c'est une méthode complémentaire à l'utilisation des moustiquaires. Cette méthode a montré des résultats encourageants au Burkina Faso dans la

réduction de la transmission du paludisme (Habluetzel *et al.*, 1997, Habluetzel *et al.*, 1999, Cuzin-Ouattara *et al.*, 1999).

- Les répulsifs, serpentins anti-moustiques, aérosols et tortillons: ce sont des produits très répandus et couramment utilisés ayant généralement pour effet de tenir les moustiques à distance.

12.2. La chimio prophylaxie

La chimio prophylaxie peut se définir comme la prise périodique d'un médicament qui protège le sujet de l'apparition et du développement morbide d'accès palustre.

- Le Traitement Préventif Intermittent chez la femme enceinte: un traitement préventif intermittent du paludisme (TPI) pour les femmes enceintes consiste à leur administrer une dose curative d'antipaludique lors des visites prénatales systématiques, indépendamment de la présence d'une infection chez la bénéficiaire. Les TPI pour les femmes enceintes réduisent les épisodes de paludisme chez la mère, l'anémie maternelle et fœtale, la parasitémie placentaire, le faible poids à la naissance et la mortalité néonatale (Gies *et al.*, 2009, White, 2005).

L'OMS recommande les TPI à base de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) dans toutes les zones d'Afrique où la transmission du paludisme est d'une intensité modérée à sévère. Depuis octobre 2012, l'OMS recommande que ce traitement préventif soit administré à toutes les femmes enceintes lors de chaque visite de soins prénataux programmée à l'exception du premier trimestre de la grossesse (WHO, 2006, WHO, 2015a).

- La Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS): Depuis 2010, l'OMS recommande la CPS pour lutter contre le paludisme à *P. falciparum* chez les enfants de moins de 5 ans. En effet dans la zone sahélienne, la mortalité et la morbidité dues au paludisme dans ce groupe d'âge sont les plus élevées durant la saison des pluies. Cette intervention consiste à l'administration de quatre doses d'un traitement complet avec la combinaison Amodiaquine + Sulfadoxine-Pyriméthamine à intervalle d'un mois (Août-Septembre-Octobre-Novembre au Burkina Faso) chez les enfants de 3 à 59 mois (Cissé *et al.*, 2006).

12.3. Vaccins antipaludiques

La complexité des plasmodies constitue un défi majeur pour l'élaboration d'un vaccin efficace contre le paludisme. Le premier vaccin antipaludique, le SPf6658, basé sur un peptide synthétique, a été mis au point en janvier 1986 par Manuel Elkin Patarroyo. Son efficacité était toutefois faible voire nulle vis-à-vis de *P. falciparum* (Bojang *et al.*, 1998). Actuellement, trois types de recherche vaccinale de deuxième génération sont en cours et sont basés sur les antigènes issus des différents stades du cycle évolutif du parasite:

- Les vaccins anti-stades exo-érythrocytaires: ils visent à empêcher le sporozoïte de pénétrer ou de se développer dans les cellules hépatiques (El Sahly *et al.*, 2010);
- Les vaccins anti-stades sanguins asexués (anti-mérozoïte): ils empêchent les mérozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les hématies (Holder *et al.*, 1999);
- Les vaccins bloquant la transmission: ils induisent des anticorps empêchant la maturation des stades sexués du parasite chez l'anophèle (Kaslow and Shiloach, 1994).

La structure «Malaria Vaccine Initiative» (MVI) a été créée dans le but de développer un vaccin antipaludique à l'horizon 2020 (Moorthy *et al.*, 2004, WHO, 1989). C'est ainsi qu'elle a entrepris le développement du candidat vaccin RTS,S en collaboration avec la firme pharmaceutique GSK et plusieurs institutions de recherche africaines et européennes. L'analyse des données de l'étude de phase 3 avec ce candidat vaccin indique que la vaccination avec RTS,S suivi d'une dose de rappel 20 mois après la première vaccination réduit le nombre de cas de paludisme chez les enfants de 5-17 mois d'environ 36% sur une moyenne de 48 mois de suivi sur l'ensemble des 11 sites ayant participé à l'étude. Chez les enfants de 6-12 semaines, cette réduction a été de 26%. Il a été constaté que cette efficacité diminuait avec le temps dans ces deux groupes d'âges. En effet, sans la dose de rappel cette efficacité serait de 28% chez les enfants de 5-17 mois et de 18% chez les nourrissons de 6-12 semaines. Du point de vue de la sécurité d'emploi du produit, RTS,S a démontré dans l'ensemble un bon profil de sécurité et de tolérance pendant toute la durée de l'étude (Moorthy and Okwo-Bele, 2015).

II. Polymorphisme génétique de *P. falciparum*

1. Le génome des plasmodiums

Le patrimoine génétique des plasmodiums, entièrement séquencé en 2002 (clone 3D7) comporte 14 chromosomes variant considérablement en taille du fait des délétions, „crossing-over“ et réarrangements. La taille du génome des plasmodies est estimée à 23 Megabases (Mb) et contient environ 5562 gènes de protéines qui codent pour 45 ARN de transfert représentant l'ensemble des anticodons. Il s'agit d'un génome biaisé avec une composition en A+T dépassant 80% (Weber, 1987). Outre l'ADN nucléaire, les plasmodies contiennent également deux éléments: un fragment d'ADN mitochondrial de 6 Kb et un fragment circulaire de 35 Kb dans l'apicoplaste (Gardner *et al.*, 2002). On distingue une soixantaine de gènes *var* repartis sur les 14 chromosomes impliqués dans la variation antigénique et la cytoadhérence. Ils occupent majoritairement une position sub-télomérique sur le chromosome et sont séparés du télomère par des séquences répétitives (*Rep 20* ou *TARE*) en nombre variable de 1 à 6 (au moins un gène *var* par télomère). Tous les gènes *var* ont une structure commune comportant deux exons séparés par un court intron (Gardner *et al.*, 2002). A côté de cette famille de gènes *var*, on distingue d'autres familles multigéniques que sont: *rifins*, *stevor*, *Pf60*. La figure 7 représente l'organisation des régions sub-télomériques des chromosomes de *P. falciparum*.

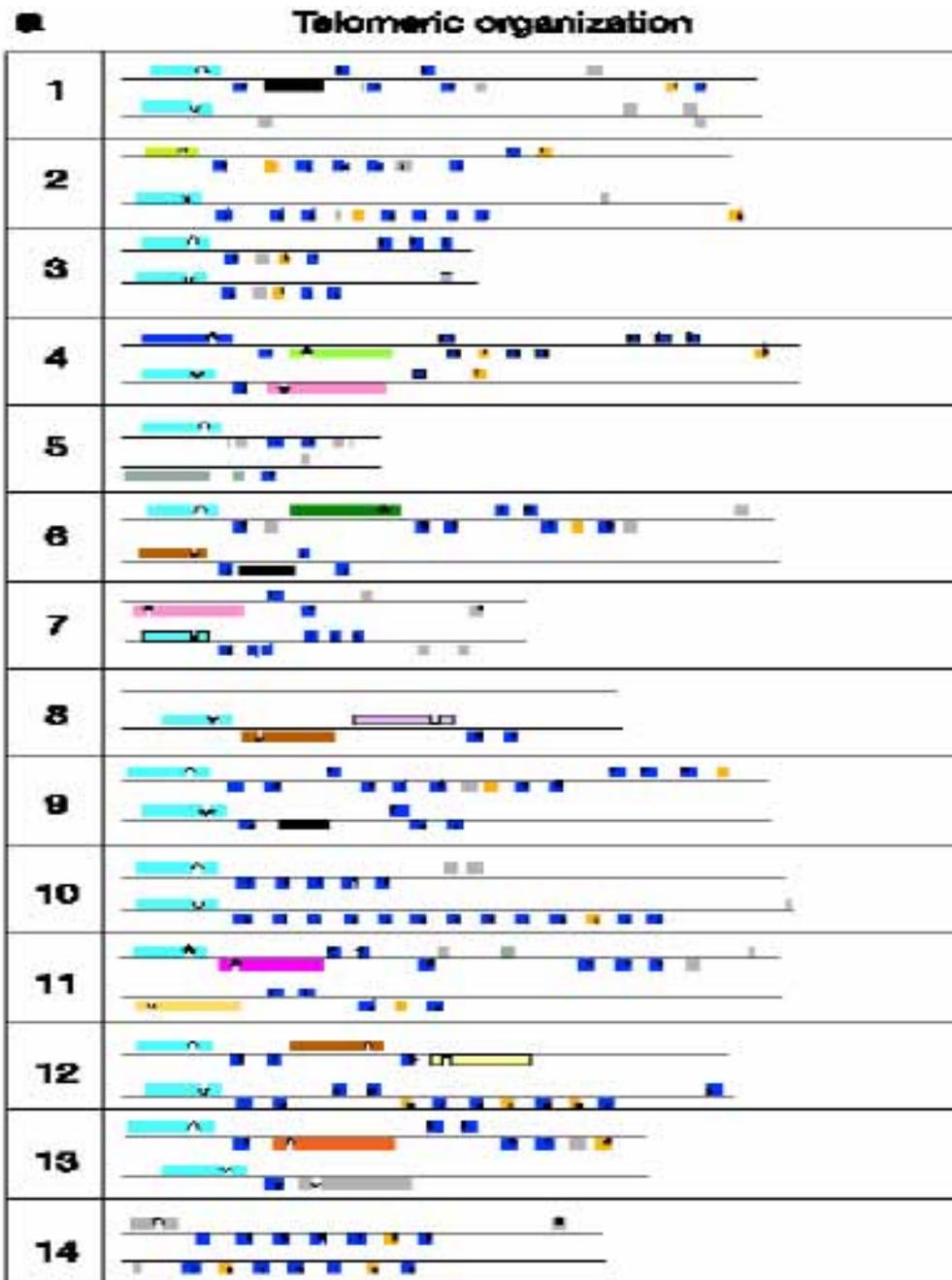


Figure 7: Organisation des régions sub-téломériques des chromosomes de *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002)

La couleur bleu foncé représente les familles des *rifins*, l'orange représente *stevor*, et le reste sont des gènes *var*.

2. Origine de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum*

Plusieurs facteurs participent à la diversité des populations plasmodiales. Il s'agit entre autre d'un important polymorphisme chromosomique *et* allélique, la reproduction asexuée et la variation antigénique.

- **Le polymorphisme chromosomique:** des séquences du gène *var* sont soumises à des recombinaisons à des fréquences beaucoup plus élevées. Ces recombinaisons se produisent entre les régions terminales de chromosomes non apparentés. Aussi, ces régions sub-télomériques des chromosomes sont le site de fréquents réarrangements génétiques intra-chromosomiques, le plus souvent par délétions des extrémités instables des chromosomes. Cela contribue de façon significative à la diversité génétique des populations parasites (Freitas-Junior *et al.*, 2000).

- **Le polymorphisme allélique:** chez *P. falciparum*, de nombreux antigènes codés par des gènes en copie unique possèdent un très grand nombre d'allèles, pouvant, parfois être regroupés en familles alléliques de séquence primaire très différente comme *msp1* et *msp2*. Les bases structurelles de ce polymorphisme sont multiples: mutations ponctuelles, présence de séquences répétées pouvant varier en nombre, en taille ou de cadre de lecture (Tanabe *et al.*, 1998, Kanunfre *et al.*, 2003).

- **La reproduction sexuée:** la reproduction sexuée du parasite chez l'anophèle contribue à la diversité génétique des populations de *P. falciparum*. Lorsqu'un anophèle ingère deux clones différents contenus dans un même repas de sang, les crossing-overs méiotiques et la ségrégation aléatoire des chromosomes permettent un réassortiment des combinaisons d'allèles et l'émergence de nouveaux génotypes (Rich *et al.*, 1997, Sinnis and Wellems, 1988).

- **L'effet de l'haploïdie:** le fait que le parasite soit sous forme haploïde dans la quasi-totalité de son cycle (en particulier chez l'homme) permet son adaptation par l'expression rapide d'un nouveau phénotype (par l'un des mécanismes décrits ci-dessus) et l'émergence rapide d'une nouvelle population mieux adaptée à son environnement (Rich *et al.*, 1997, Sinnis and Wellems, 1988).

- **La variation antigénique:** la forte pression de sélection exercée par la diversité de l'hôte, a contraint le parasite à une meilleure adaptabilité et à sélectionner la mise en place «d'un processus de variation phénotypique programmé»: la variation antigénique. La quasi-totalité de l'adhésion du parasite aux cellules de l'hôte est réalisée par l'intermédiaire d'une molécule, «l'Erythrocyte Membrane Protein 1» (*PfEMP1*), exprimée par le parasite et transportée à la surface des globules rouges infectés. Ces protéines de surface sont exposées au système immunitaire de l'hôte. En réponse à ces attaques, le parasite produit sans cesse de nouveaux variants de *PfEMP1* qui viennent remplacer le précédent variant à la surface des cellules. La variation antigénique chez *P. falciparum* a trois fonctions: une fonction d'échappement au système immunitaire, une fonction d'immunorégulation et une fonction d'adaptation aux récepteurs endothéliaux de l'hôte (Kyes *et al.*, 2001).

3. Les gènes polymorphiques de *P. falciparum*

Plusieurs gènes sont impliqués dans la diversité génétique de *P. falciparum*. Les gènes polymorphiques les plus fréquemment utilisés pour la distinction des populations parasitaires sont: *msp1*, *msp2*, *Glurp* et quelque fois les microsatellites.

1.1 La protéine de surface du mérozoïte *msp1*

Le gène codant cette protéine est localisé sur le chromosome 9. Le gène *msp1* comporte 17 blocs dont 5 séquences conservées, 5 semi-conservées et 7 variables. Le bloc 2 est le plus polymorphe et comporte 3 lignées: K1, *MAD20* et RO33 (Tanabe *et al.*, 1998). Il a été suggéré que *msp1* joue un rôle dans l'interaction hôte-parasite en s'attachant au ligand acide sialique sur les érythrocytes humains (Cowman and Crabb, 2006). L'antigène *msp1* est considéré comme un candidat de choix pour le développement d'un vaccin contre les formes sanguines et constitue de ce fait l'un des marqueurs de polymorphisme les plus couramment étudiés (Tanabe *et al.*, 1998, Hamid *et al.*, 2013, Brockman *et al.*, 1999). La figure 8 illustre la structure du gène *msp1*.

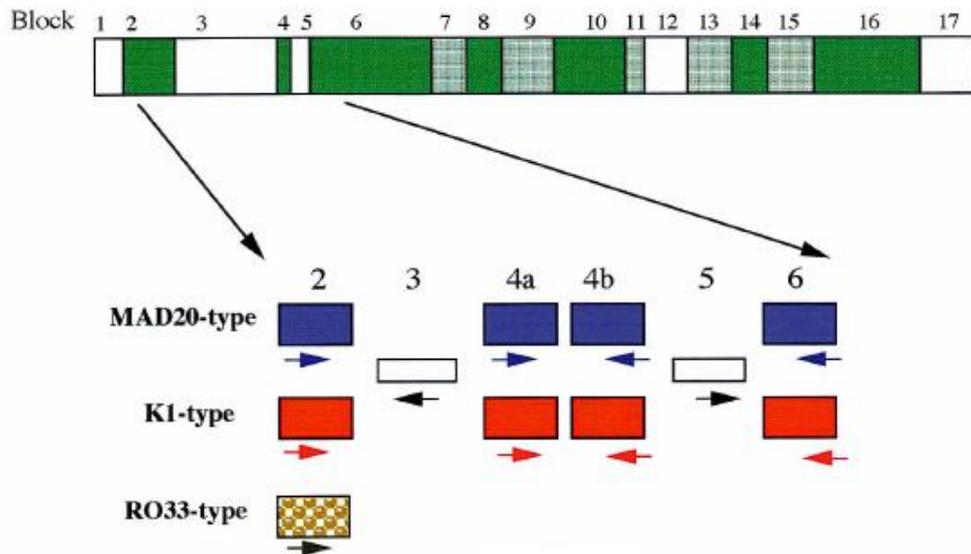


Figure 8: représentation de la structure de *msp1*(Tanabe *et al.*, 1998)

La figure montre un important polymorphisme au niveau du bloc 2 du gène qui comporte les trois lignées K1, MAD20 et RO33. Ainsi toutes les souches de *P. falciparum* correspondent à l'une des trois familles alléliques et cela fait de *msp1* un bon marqueur polymorphique pour la distinction des populations parasitaires.

1.2 La protéine de surface du mérozoïte *msp2*

La protéine *msp2* est une protéine de 45 Kd codée par un gène localisé sur le chromosome 2. Le gène est divisé en cinq blocs dont les blocs 1,2 4 et 5 situés aux deux extrémités sont conservés ou semi-conservés. Les allèles de la protéine 2 de surface du mérozoïte sont regroupés en 2 familles principales 3D7 et FC27, correspondant à la structure dimorphique de la région centrale variable (Bloc 3) (Boyle *et al.*, 2014, Low *et al.*, 2007, Kanunfre *et al.*, 2003). La figure 9 présente une description de la structure du gène *msp2*, mettant en évidence la différence entre les deux familles alléliques.

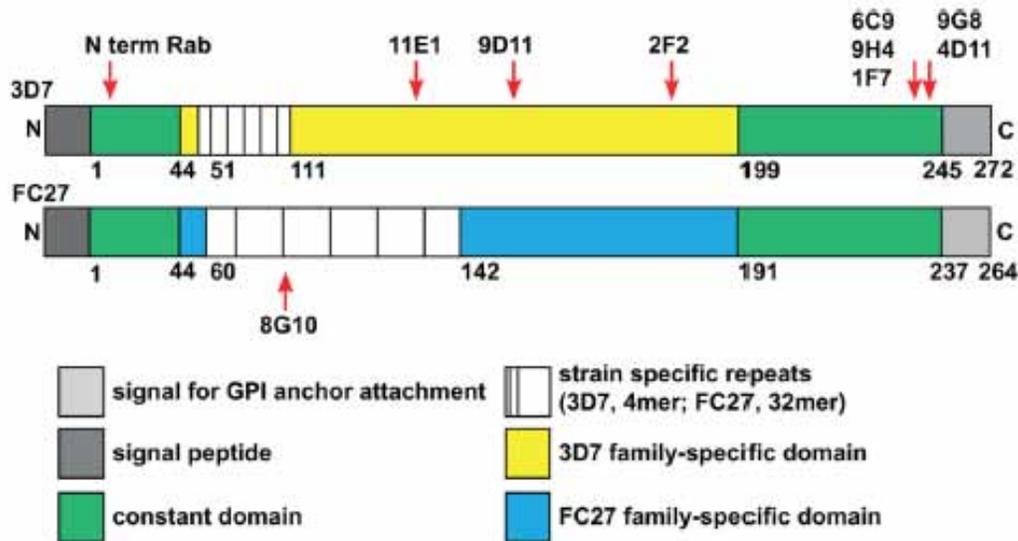


Figure 9: Représentation de la structure des deux familles alléliques de *msp2* (Boyle *et al.*, 2014)

La variabilité du block central de *msp2* permet de classer les populations parasites suivant les deux familles alléliques 3D7 et FC27. La famille FC27 renferme 2 copies d'un motif de 32 acides aminés dont la séquence est la suivante ADTIASGSQRSTNSASTSTTNGESQTTTPTA, suivie d'une copie d'un motif de 12 acides aminés comme suit: ESISPPITTT. La famille 3D7 renferme un nombre de répétitions d'un motif de quatre acides aminés que sont: GGSA (Boyle *et al.*, 2014, Low *et al.*, 2007, Kanunfre *et al.*, 2003). La protéine *msp2* entraîne une réponse immunitaire et constitue un candidat de choix pour l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme. Ce polymorphisme marqué de *msp2* fait de lui l'un des marqueurs les plus étudiés, surtout dans la distinction des populations parasites pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutiques des médicaments antipaludiques (Hamid *et al.*, 2013, Brockman *et al.*, 1999).

1.3 Le gène du Glutamate rich Protein (*Glurp*)

C'est une protéine de 220 kDa renfermant 1271 acides aminés qui est exprimée lors du stade schizonte hépatique et à la surface du mérozoïte dans les globules rouges infectés. Le gène est localisé sur le chromosome 10. C'est une protéine couramment utilisée pour la

distinction des populations parasites (recrudescence *versus* nouvelle infection) lors des essais cliniques. Elle comporte une région N-terminale conservée dénommée R0 et 2 régions répétées polymorphes dénommée R1 et R2 (de Stricker *et al.*, 2000). La figure 10 ci-dessous illustre la structure de cette protéine:

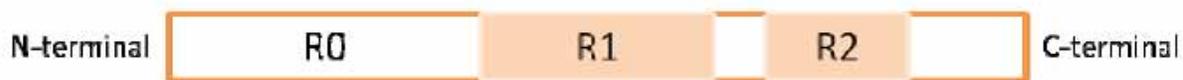


Figure 10: Représentation schématique de la structure du *Glurp* (Borre *et al.*, 1991)

1.4 Les microsatellites

Outre le polymorphisme alléliques des gènes précédemment listés, il existe une très grande variabilité au niveau des parties non codantes de l'ADN de *P. falciparum*. Ces parties non codantes de l'ADN sont structurées en motifs de mono, di, tri, ou tétra-nucléotides répétitifs en tandem appelés microsatellites utilisés pour la différenciation des populations parasites. Les microsatellites sont repartis sur toute l'étendue du génome du parasite. Quelques exemples de microsatellites fréquemment étudiés sont: PolyA (Chr4), TA42 (Chr5), TA81 (Chr5), TA1 (Chr6), TA109 (Chr6), TA87 (Chr6), TA40 (Chr10), 2490 (Chr10), ARAII (Chr11), pfG377 (Chr12), PfPk2 (Chr12) et TA60 (Chr13) (Anderson *et al.*, 2000).

III. La chimiorésistance de *P. falciparum* et les marqueurs moléculaires de la résistance

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques et celle de l'anophèle aux insecticides constitue un grand obstacle dans la lutte contre le paludisme. En effet, le nombre de décès dus au paludisme a considérablement augmenté en Afrique Sub-Saharienne après l'émergence de la résistance à la chloroquine (Trape, 2001).

1. Définition

L'OMS définit la chimiorésistance comme étant l'aptitude d'une souche parasite (*Plasmodium*) à survivre et ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles qui sont habituellement

recommandées mais qui restent dans les limites de tolérance du sujet. Il a été ajouté en 1986 que la forme active du médicament devrait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale (Miller *et al.*, 2005, WHO, 1973, Basco and Ringwald, 1999).

2. Historique de la Chimiorésistance

Les premiers cas de résistance à la Chloroquine sont apparus dans les années 1957 en Asie et en Amérique du Sud. Le continent africain a été touché dans les années 1977 (Kenya, Tanzanie) (Hess *et al.*, 1983, Herzog *et al.*, 1983). Au Burkina Faso, les premiers cas de résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la CQ ont été signalés en 1983 dans la région de Koudougou (Baudon *et al.*, 1984). Cette résistance a été confirmée *in vivo* par Guiguemdé *et al.* en 1988 à Bobo-Dioulasso (Guiguemde *et al.*, 1994). Les premiers cas de résistance à la Quinine ont été observés dans les années 1960 au Brésil et en Asie du Sud-Est. L'apparition et la propagation de souches résistantes à la Méfloquine ont été signalées depuis les années 1970 en Asie. Bien que la Sulfadoxine-Pyriméthamine, utilisée comme traitement préventif intermittent chez la femme enceinte montre des résultats toujours satisfaisants, les premiers cas de résistance à cette molécule ont été rapportés dans la même région d'Asie du Sud-Est. Cette résistance s'est propagée vers l'Afrique Sub-Saharienne en commençant par l'Afrique de l'Est (Tanzanie- Kenya) vers 1982 (Hess *et al.*, 1983, Herzog *et al.*, 1983). Au cours de ces dernières années, les CTA qui constituent aujourd'hui l'alternative par excellence pour le traitement du paludisme simple connaissent une baisse de sensibilité dans certains endroits et plus encore, des cas de résistance ont été documentés dans cinq pays de l'Asie du Sud-Est: Cambodge, Thaïlande, Myanmar, Viêtnam et au Laos (Noedl *et al.*, 2009). Face à un ce phénomène, une surveillance de la résistance est nécessaire pour préserver l'efficacité à long terme des CTA.

3. Mécanisme de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

Les mécanismes développés par le parasite pour résister aux antipaludiques ne sont pas clairement élucidés pour tous les antipaludiques disponibles. Cependant, les principaux mécanismes évoqués peuvent être résumés comme suit:

a. L'efflux du médicament: Il s'agit d'une perte du mécanisme d'accumulation du médicament, couramment observée chez les lysosomotropes telles que la Chloroquine, la Quinine, l'Amodiaquine, la Méfloquine, la Luméfantrine et l'Artémisinine. La Chloroquine par exemple agit par accumulation suivant un gradient de pH dans la vacuole digestive du parasite (trophozoïtes âgés, schizontes immatures). Le médicament se fixe à l'hématine pour former un complexe toxique et inhiber sa détoxification sous forme d'hémozoïne. Les souches résistantes présentent une altération de l'accumulation de la Chloroquine dans la vacuole digestive (Krogstad *et al.*, 1987).

Dans le chloroquino-résistance, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'efflux du médicament: (i) altération des gradients de pH et ou de la perméabilité membranaire, (ii) intervention de la P-glycoprotéine homologue 1 (*Pgh1*) entraînant une diminution de la captation de la molécule, (iii) mutations ponctuelles des gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1* ainsi qu'une variation du nombre de copie de ce gène.

b. Modification de la cible: ce mécanisme est observé dans la résistance aux antimétabolites (antifoliques, antifoliniques et Atovaquone). Les cibles de ces inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques sont la dihydro-folate réductase (*dhfr*) et la dihydro-ptéroate syntétase (*dhps*) pour les antifoliniques et les antifoliques respectivement (Talisuna *et al.*, 2004). Pour l'Atovaquone, l'implication du gène *P. falciparum* cytochrome b (*Pfcty b*) a été rapportée (Schwöbel *et al.*, 2003). Des mutations ponctuelles au niveau de ces gènes constituent les bases moléculaires de la résistance à ces composés.

c. Inhibition de l'entrée du médicament: ce mécanisme est basé sur l'action des transporteurs transmembranaires (par exemples les pompes ATPase) pour empêcher la pénétration du médicament (Nikaido, 2001).

d. La «dormance»: ce mécanisme a été décrit récemment dans la résistance de *P. falciparum* à l'Artémisinine et se caractérise par un arrêt de développement (dormance) des parasites lorsqu'ils sont exposés au médicament (Witkowski *et al.*, 2013).

4. Méthodes d'études de la chimiorésistance

La surveillance de la sensibilité aux antipaludiques est maintenant une composante clé des programmes de lutte, eu égard à la réalité du phénomène et son expansion rapide dans le temps et dans l'espace. Cette surveillance vise à confirmer que les politiques actuelles répondent aux besoins des malades ou dans le cas échéant, fournir la preuve pour un changement de politique le plus tôt possible.

Plusieurs méthodes permettent de mesurer la sensibilité de *P. falciparum* vis-à-vis des médicaments antipaludiques disponibles. Chacune des méthodes a ses avantages et ses inconvénients et donc le choix d'une méthode dépendra des objectifs visés.

4.1. Les tests *in vivo*

Cette technique consiste à l'évaluation directe de l'efficacité thérapeutique d'un antipaludique chez des patients souffrant de paludisme. Les doses ordinairement recommandées de l'antipaludique sont administrées aux patients qui sont suivis pendant une période donnée pour l'évaluation des paramètres cliniques et biologiques. En fonction de la période de suivi et des paramètres évalués, plusieurs protocoles ont été proposés. Ces protocoles ont été adaptés au fur et à mesure et tiennent compte aujourd'hui des signes cliniques, de la pharmacocinétique du médicament mais aussi du polymorphisme des populations parasitaires. Ainsi, selon le protocole le plus récent proposé par l'OMS en 2003, les critères d'évaluation de l'efficacité thérapeutiques d'un antipaludique sont définis après un suivi de 28-42 jours. Les critères d'évaluation sont: (i) Echec Thérapeutique Précoce (ETP), (ii) Echec Thérapeutique Tardif (ETT) qui représente l'Echec Parasitologique Tardif (EPT) et l'Echec Clinique Tardif (ECT) et enfin (iii) la Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) qui est l'absence de parasitémie au cours du suivi quelle que soit la température axillaire sans qu'aucun des critères ci-dessus cités n'ait été satisfait (WHO, 2003a).

Les limites de cette méthode concernent la difficulté de sa mise en œuvre (recrutement et suivi des patients). Aussi, l'échec thérapeutique ne signifie pas chimiorésistance. A cela s'ajoutent l'effet de l'absorption et de métabolisation du médicament mais aussi l'effet de l'interférence de la réponse immunitaire de l'hôte qui ne sont pas toujours facile à discriminer.

4.2. Les tests *in vitro* / *ex vivo*

Les tests *in vitro* sont basés sur le principe que le parasite *P. falciparum* soit cultivable (maturation des trophozoïtes jeunes en schizontes mûrs) sur un milieu de culture et consistent à mesurer l'effet direct (inhibiteur) d'un antipaludique sur le parasite. En effet, la culture *in vitro* de *P. falciparum* permet de déterminer le phénotype résistant et de surveiller l'efficacité des antipaludiques. Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Roswell Park Medium Institute). Les tests *in vitro* présentent de nombreux avantages. Ils permettent de tester plusieurs antipaludiques à la fois sur les mêmes isolats. La sensibilité des souches au médicament est mesurée sans interférence avec le système immunitaire et les variations interindividuelles du métabolisme, contrairement au test *in vivo*. Plusieurs variantes de tests *in vitro* ont été décrites:

- Le macrotest OMS couramment appelé test standard de l'OMS: ce test consiste en l'incubation à 37°C dans une cloche à bougie des échantillons en présence de concentrations croissantes du médicament. Après 24 à 30 heures d'incubation, des frottis sanguins sont réalisés pour l'évaluation de la maturation des trophozoïtes en schizontes par microscopie. La sensibilité de l'isolat est déterminée par le degré d'inhibition de cette maturation et les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI) (Rieckmann *et al.*, 1968).
- Le microtest isotopique: ce test a été initialement décrit par Desjardins en 1979. Il s'agit d'une méthode semi-automatisée qui mesure la sensibilité du parasite au médicament par l'estimation de la quantité d'hypoxanthine radio-marquée incorporée par le parasite. Un compteur à scintillation est utilisé pour mesurer la radioactivité après 42 à 48 heures d'incubation. Les résultats sont donnés en coup par minute (CPM) tandis que l'activité inhibitrice du médicament est donnée en concentration inhibitrice 50% (CI50) ou en CI90 (Rieckmann *et al.*, 1978).
- Le "Ring-stage Survival Assay": cette nouvelle technique a été développée par l'institut Pasteur du Cambodge pour étudier la sensibilité du parasite à l'Artémisinine et ses dérivés. Elle consiste à exposer les jeunes trophozoïtes (stade anneau) à une dose élevée de Dihydroartémisinine pour une durée similaire à celle qui est observée chez l'homme au cours d'un traitement par les dérivés de l'Artémisinine (700 nM pendant 6 h). Les résultats sont

exprimés en proportion de parasites survivants après cette exposition. Cette technique a permis de montrer que la résistance ne concernait que le stade anneau, les formes mûres demeurant sensibles à l'Artémisinine (Witkowski *et al.*, 2013).

➤ Le test de cytométrie de flux: c'est une méthode simple, utilisant un appareil (le cytomètre de flux) pour quantifier les érythrocytes infectés marqués par un fluorochrome (Bianco *et al.*, 1986, Bei *et al.*, 2010).

➤ Le test *pLDH* de l'activité enzymatique: il s'agit d'une méthode immunochromatographique utilisée pour détecter la présence de *P. falciparum* mais aussi pour tester sa sensibilité aux antipaludiques. Il est basé sur le principe qu'à l'enzyme, le *Plasmodium* lactate déshydrogénase, d'utiliser rapidement le 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (APAD), un analogue du NAD pour former du pyruvate en présence de l'antipaludique étudié. La LDH est un bon indicateur de la présence de *Plasmodium* dont le niveau augmente avec la parasitémie et diminue avec le traitement (Kaddouri *et al.*, 2006).

➤ Les tests ELISA: Ce sont des tests d'immuno-capture d'antigène très sensibles. La variante *pLDH*-ELISA vise à détecter l'enzyme métabolique, le *Plasmodium* lactate déshydrogénase, présent dans les érythrocytes parasités. Les hématies parasitées sont mis en culture dans une plaque ELISA contenant l'antipaludique puis incubées à 37°C dans une étuve à CO₂. Des anticorps monoclonaux sont utilisés pour détecter la *pLDH* produite lors de la multiplication des parasites. L'ELISA-HRP2 en est une autre composante qui mesure l'activité de l'histidine rich-protein produite au cours de la croissance et de la multiplication du parasite (Noedl *et al.*, 2005).

4.3. La surveillance des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques

L'étude des marqueurs moléculaires a vu le jour grâce aux progrès réalisés en Biologie moléculaire. Il s'agit de méthodes de génotypage réalisées sur l'ADN du parasite pour rechercher des modifications au niveau des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques. Plusieurs marqueurs moléculaires associés à la résistance aux antipaludiques ont été décrits (Pradines *et al.*, 2010, Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009):

- **Le gène *P. falciparum* «chloroquine resistance transporter gene» (*Pfcr1*):** ce gène, localisé sur le chromosome 7 code pour une protéine membranaire impliquée dans le transport du médicament vers l'intérieur de la cellule. Une mutation au niveau du codon 76 qui induit un changement au niveau de la protéine par remplacement de l'acide aminé lysine (K) par la thréonine (T) est fortement associée à la résistance à la Chloroquine (CQ) et à l'Amodiaquine par résistance croisée (Djimé *et al.*, 2001, Ursing *et al.*, 2006).
- **Le gène *Pfmdr1* (*P. falciparum* «multi-drugs resistance gene» 1):** ce gène est localisé sur le chromosome 5 et code pour une protéine membranaire dont l'implication dans la résistance à la Chloroquine et à l'Amodiaquine a été évoquée. Plusieurs mutations ponctuelles y sont décrites (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y) (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Humphreys *et al.*, 2007, Tinto *et al.*, 2008, Djimé *et al.*, 2001).
- **Le gène dihydroptéroate synthétase (*dhps*):** il est localisé sur le chromosome 8. Ce gène code pour une enzyme qui synthétise la ptéroate, impliquée dans la synthèse de *novo* des bases pyrimidiques. Elle est la cible d'antipaludiques comme les sulfamides dont la Sulfadoxine et des mutations ponctuelles au niveau du gène (S436F/A, A437G, K540Q, A581G, A613T/S) constituent les bases moléculaires de la résistance à ces molécules (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Happi *et al.*, 2005).
- **Le gène *P. falciparum* dihydrofolate réductase thymidilate synthétase (*dhfr-ts*):** ce gène est localisé sur le chromosome 4 et code pour une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide folinique. Cette protéine constitue la cible des antifoliniques (Pyriméthamine, Proguanil) et l'implication de mutations ponctuelles sur ce gène (A16V, C50A, N51I, C59R, S108N/T I164L) dans la résistance à ces antipaludiques a été signalée (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Tinto *et al.*, 2007, Talisuna *et al.*, 2004).
- **Le gène *P. falciparum* cytochrome b (*Pfcytb*):** ce gène est localisé au niveau de l'ADN mitochondrial et code pour le cytochrome b qui est la cible moléculaire de l'Atovaquone. Les mutations Tyr268Asn et Tyr268Ser y sont décrites et sont associées à la baisse de sensibilité à cette molécule (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Schwöbel *et al.*, 2003).
- **Le gène *P. falciparum* multidrug resistance associated protein (*Pfmrp*):** ce gène est localisé sur le chromosome 1. Il code pour une protéine membranaire vacuolaire jouant le rôle

d'ABC transporteur. Les mutations ponctuelles qui y sont décrites sont les suivantes: His191Tyr et Ser437Ala. Ces mutations sont associées à la diminution de la sensibilité à la CQ, AQ et à la Quinine. Une autre mutation ponctuelle y est décrite (Lys1466 Arg) et semble être impliquée dans la résistance à la SP (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Raj *et al.*, 2009).

➤ **Le gène *P. falciparum* sodium / hydrogen exchanger (*Pfnhe-1*):** ce gène est localisé dans la région microsatellite intra génique ms4760. Des répétitions en tandem de motifs peptidiques (DNNND>2 ou NHNDNHNNDDD<3) y ont été décrites et seraient à l'origine de la baisse de sensibilité à la Quinine (Eboumbou Moukoko *et al.*, 2009, Henry *et al.*, 2009).

➤ **Le gène *P. falciparum* multidrug transporter (*Pfmdt*):** localisé sur le chromosome 3, ce gène code pour une protéine de transport membranaire de médicament analogue à la tétracycline. L'augmentation du nombre de copies de ce gène serait associée à la diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la Doxycycline (Briolant *et al.*, 2010).

➤ **Le gène *P. falciparum* tetracycline resistance (*PftetQ*):** il s'agit d'un gène localisé sur le chromosome 12 et qui code pour une protéine de la famille des GTPases. La variation du nombre de motifs KYNNNN serait associée à la diminution de la sensibilité *in vitro* à la Doxycycline (Briolant *et al.*, 2010).

Pour les dérivés de l'Artémisinine, l'implication des mutations au niveau du gène *P. falciparum* adénosine triphosphatase-6 (PfATPase 6) avait été évoquée mais le polymorphisme élevé de ce gène constitue un handicap. Les points de mutations suivants ont été observés: L263E, E431K, A623E, S769N. (Menegon *et al.*, 2008, Dondorp *et al.*, 2009).

Récemment, l'implication du marqueur Kelch 13-propeller localisé au niveau du chromosome 13 dans la résistance aux dérivés d'Artémisinine a été démontrée (Ariey *et al.*, 2014). Plus d'une centaine de mutations ponctuelles y sont décrites. Cependant, l'expression et la distribution de ces mutations diffèrent d'une région à l'autre. En Asie, les mutations suivantes sont les plus couramment observées: N87K, G112E, L143P, E130G, T149S, A175T, K189T, K189N, R223K, E252Q, R255K, D281V, K438N, P441L, F446I, G449A, N458Y, M476I, A481V, Y493H, S522C, N525D, N537I, G538V, R539T, I543T, P553L, R561H, V568G, P574L, A578S, C580Y, Q613E, F614L, A675V, H719N (Ashley *et al.*, 2014). Dans cette zone géographique, on rencontre des mutations (généralement celles après

le point 440) qui sont associées à la résistance aux CTA. Les plus fréquentes d'entre elles sont: C580Y, R539T, I543T, Y493H (Ashley *et al.*, 2014). Par contre, les mutations retrouvées en Afrique (dont la plus fréquente est A578S) sont généralement neutres (non associées à la résistance aux CTA) (Ménard *et al.*, 2016).

5. Facteurs favorisant la résistance aux antipaludiques

Plusieurs facteurs favorisent le développement et l'extension de la résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques.

5.1. La pression médicamenteuse

La pression médicamenteuse joue un rôle fondamental dans l'apparition de la chimiorésistance. La sélection de souches plasmodiales de sensibilité de plus en plus faible est favorisée par la présence dans le sang d'antipaludiques à des concentrations sub-curatives qui n'éliminent que les parasites les plus sensibles, permettant à ceux qui sont moins sensibles de survivre. Ainsi, au fur et à mesure que ce phénomène se poursuit, les souches très sensibles disparaissent progressivement (éliminées par le traitement) et les souches de sensibilité réduite deviendront prédominantes dans la population parasitaire de cette zone (Pradines *et al.*, 2010).

5.2. La diversité génétique des souches

La grande diversité génétique de *P. falciparum* est à la fois cause et conséquence du taux très élevé de mutations dans son génome. Lorsque ces mutations ne sont ni létales, ni silencieuses, elles peuvent dans certains cas conduire à l'apparition de nouveaux phénotypes plus résistants (Wernsdorfer, 1994).

5.3. Le degré d'immunité de la population

Une protection immunitaire efficace permet une meilleure clairance parasitaire, augmentant ainsi l'efficacité thérapeutique des médicaments. Cependant, lorsque le niveau d'immunité n'est pas suffisant comme c'est le cas pour les sujets non immuns (expatriés, jeunes enfants sans prémunition) ou ceux en état de déficit immunitaire, cela est favorable au

développement de la résistance. C'est en effet dans ce groupe de sujets non immuns que les premiers cas de résistance sont généralement observés (Wernsdorfer, 1994).

5.4. Les migrations

Les mouvements de population (voyages, réfugiés, transhumance...) constituent également un facteur favorisant l'expansion de la résistance. Le déplacement d'individus infestés d'une zone où sévit la résistance à un médicament vers une autre zone où elle n'existe pas entraîne la propagation des souches résistantes dans la zone d'accueil. Ce phénomène a joué un rôle crucial dans l'expansion de la Chloroquino-résistance (Verdrager, 1986, Wernsdorfer, 1994).

5.5. Le rôle du vecteur

Les recombinaisons génétiques au niveau du moustique favorisent la dissémination des gènes résistants. Aussi, certaines espèces pourraient être plus favorables à la transmission de souches résistantes que d'autres. C'est le cas de *Anopheles balabacensi* qui s'est révélé comme un bon vecteur dans la transmission de souches chloroquino-résistantes en Asie du Sud-Est (Verdrager, 1986, Wernsdorfer, 1994).

5.6. Les facteurs environnementaux

Les conditions climatiques déterminent l'intensité de la transmission du paludisme dans une zone. C'est le cas des zones tropicales où les conditions climatiques sont favorables au maintien du cycle de développement du parasite. Ayant un impact sur la majorité des facteurs énumérés ci-dessus, l'environnement représente un facteur favorisant la résistance (Wernsdorfer, 1994).

Avec l'avènement de la chimiorésistance de *P. falciparum* aux CTA en Asie du Sud-Est, tous les regards sont actuellement tournés sur la compréhension des mécanismes de résistance du parasite. Etant donné qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement qui soit plus efficace et plus efficient que les CTA pour le traitement du paludisme simple, il convient de renforcer la surveillance de cette résistance pour éviter son émergence et limiter sa

propagation en Afrique Sub-Saharienne. Le chapitre suivant s'inscrit dans cette optique par la surveillance *in vivo* de l'efficacité des deux traitements antipaludiques de première intention adoptés par le Burkina Faso.

Chapitre 3: Efficacité et tolérance de Artésunate-Amodiaquine comparée à Artéméther-Luméfantrine en conditions réelles d'utilisation au Burkina Faso

I. Introduction

Pour faire face à la résistance à la Chloroquine, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'utilisation des CTA pour le traitement du paludisme simple (WHO, 2015a). Le Burkina Faso a adopté en 2005 les combinaisons Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artéméther-Luméfantrine (AL) comme traitement de première ligne pour la prise en charge du paludisme simple (MS, 2006b). De façon générale, plusieurs essais cliniques ont montré que ces médicaments étaient efficaces et bien tolérés (Zongo *et al.*, 2007a, Zongo *et al.*, 2007b, Kobbe *et al.*, 2008, Yavo *et al.*, 2015). Cependant, les conditions dans lesquelles ces études ont été conduites (supervision des prises, strict respect des exigences du fabricant) ne reflètent pas les conditions réelles d'utilisation de ces médicaments sur le terrain. Cela amène à penser que l'efficacité rapportée dans ces essais cliniques classiques pourrait différer de la réalité sur le terrain. En effet, une étude conduite chez les enfants à Nanoro par Tinto *et al.*, a montré une baisse d'efficacité quand les prises du médicament n'étaient pas supervisées (Tinto *et al.*, 2014b). Aussi, la plupart des études a été conduite sur des enfants de moins de cinq ans, les sujets plus âgés étant généralement exclus. Cependant, malgré l'effet additif en termes de clairance parasitaire que confère la prémunition chez les sujets âgés, certains comportements des adultes vis-à-vis du médicament pourraient négativement influencer l'efficacité du traitement. Par exemple, les interruptions volontaires des traitements à cause des effets aderses seraient plus fréquentes chez les adultes que chez les enfants. En outre, il est plus facile d'obtenir des données de tolérance beaucoup plus fiables chez les sujets âgés que chez les enfants qui ont généralement des difficultés pour décrire certains de ces effets aderses (le plus souvent rapportés approximativement par les mères). C'est au regard de tous ces aspects que cette étude a été conduite pour évaluer l'efficacité et la tolérance de ASAQ *versus* AL en conditions réelles d'utilisation et dans tous les groupes d'âge à Nanoro au Burkina Faso.

II. Matériel et Méthodes

1. Site de l'étude

L'étude s'est déroulée à Nanoro dans la Province du Boulkiemdé au Burkina Faso en Afrique de l'Ouest. Le District sanitaire de Nanoro (DSN) est l'un des cinq districts de la région sanitaire du Centre-Ouest du Burkina Faso. La population totale de la zone était estimée à 158.127 habitants en 2014 et couvre une superficie de 1302 Km², soit 5,98% de la superficie de la région du centre ouest (MS, 2013). Le climat est de type soudano-sahélien, avec une saison des pluies de Juin/Juillet à Octobre/Novembre avec une pluviométrie moyenne estimée entre 450-700 mm par an. Cette saison pluvieuse est suivie d'une saison froide et sèche de Novembre à Février (température minimum 17°C) et d'une saison chaude et sèche de Mars à Mai (températures maximum de 43°C). Le paludisme est hyper-endémique avec une transmission saisonnière pendant la saison des pluies. Les études entomologiques plus récentes conduites au Burkina Faso indiquent que les vecteurs les plus courants sont *Anopheles gambiae s.s.* et *An. arabiensis* (Badolo *et al.*, 2012). *P. falciparum* est le principal agent pathogène, suivi de *P. malariae* et de *P. ovale* (Sondo *et al.*, 2015a).

La collecte des données s'est effectuée dans les Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Nanoro et de Nazoanga (figure 10). Le CSPS de Nanoro est situé au centre de la commune rurale de Nanoro et couvre 5 villages: Nanoro, Basziri, Goulouré, Poéssie et Gouroumbila. Le CSPS de Nazoanga est situé à environ 15 km au Sud-Est de la commune de Nanoro et couvre les villages de Nazoanga, Zimidin et Sitaon (MS, 2013). La figure 11 indique l'emplacement du CSPS de Nanoro et celui de Nazoanga sur la carte du district sanitaire de Nanoro:

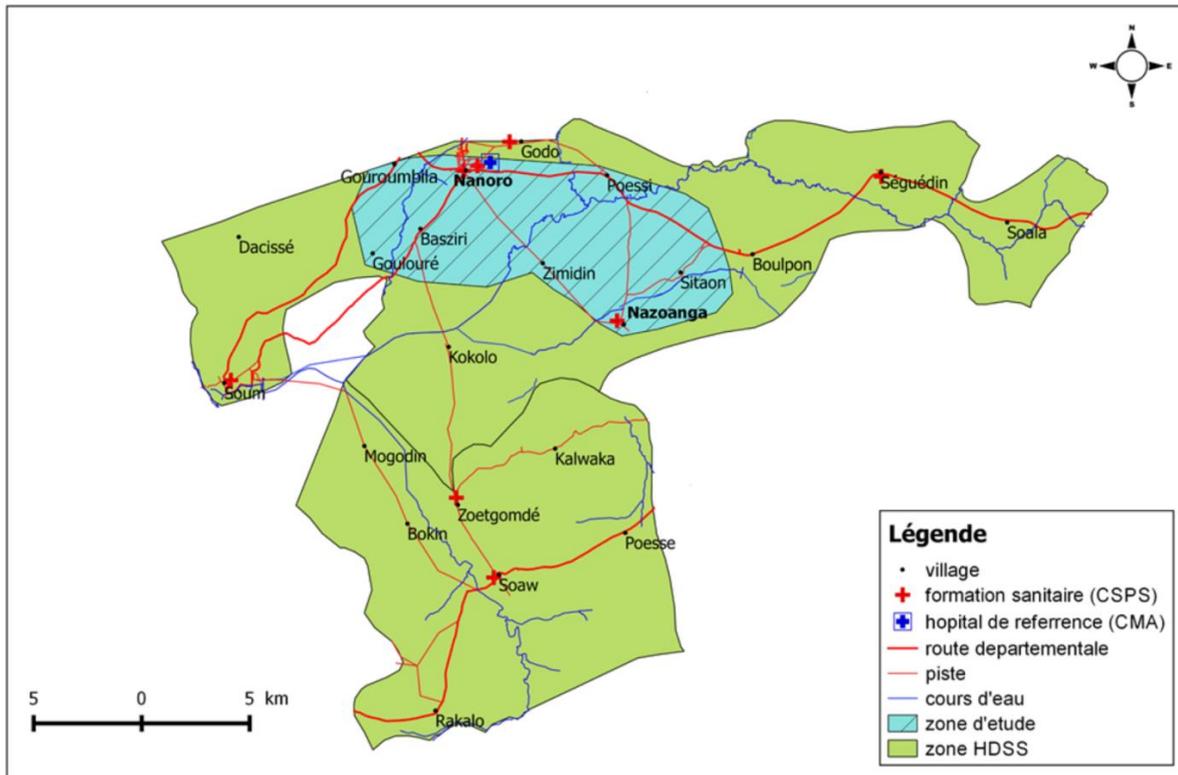


Figure 11: Cartographie de la zone d'étude (Derra *et al.*, 2012)

2. Type, population et période d'étude

L'étude s'est déroulée entre Septembre 2010 et Octobre 2012. Il s'agissait d'un essai clinique randomisé pour comparer l'efficacité et la tolérance d'Artésunate-Amodiaquine *versus* Artéméther-Luméfantrine dans les conditions réelles de leur utilisation appelé «effectiveness». Ce volet «effectiveness» s'inscrivait dans le cadre d'une étude plus large intitulée «Pharmacovigilance des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine en Afrique».

La taille de l'échantillon était déterminée en supposant au départ que les deux traitements auront chacun une efficacité d'au moins 90%. Dans ces circonstances, un échantillon de 155 participants par bras permettra de détecter avec une précision de 5% et une puissance de 90%, une différence d'efficacité ne dépassant pas 10% entre les deux bras de traitement. En estimant les perdus de vue à 10%, une taille de 170 participants /bras/année était nécessaire, soit 340 pour les deux ans.

Les critères d'inclusion étaient définis comme suit: (i) fièvre ou histoire de fièvre des 24 h précédentes, (ii) mono infection à *P. falciparum*, (iii) densité parasitaire comprise entre 2.000 et 200.000 formes asexuées par microlitre de sang, (iv) hémoglobine >5g/dL. Les patients étaient exclus de l'étude s'ils présentaient: (i) des signes de danger (incapacité de boire ou d'allaiter; vomissement plus de deux fois en 24 h; histoire récente de convulsions; inconscience ou incapacité de s'asseoir ou de s'arrêter), (ii) paludisme grave, (iii) histoire documentée de prise de traitement antipaludique ou antibiotique ayant une activité antiplasmodiale dans les deux dernières semaines, (iv) toute évidence de maladie chronique ou autre maladie fébrile concomitante, (v) histoire d'intolérance ou d'allergie connue aux médicaments de l'étude et refus du patient ou des parents / tuteurs de donner leur consentement éclairé et écrit à participer à l'étude, (vi) toute évidence d'une grossesse en cours pour les femmes en âge de procréer.

Les échantillons de sang séchés (confettis) collectés lors de ce volet ont été utilisés pour les analyses moléculaires par PCR pour étudier le polymorphisme de *P. falciparum* et les marqueurs moléculaires de la résistance.

3. Administration des traitements, suivi des patients et collecte des données

Les patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum* ont été enrôlés et randomisés de sorte à recevoir comme traitement ASAQ ou AL. La procédure de randomisation a consisté à générer des numéros de façon aléatoire à l'ordinateur correspondant aux traitements, avec un pas de 10. Ces numéros étaient ensuite placés dans des enveloppes scellées qui n'étaient ouvertes qu'après vérification de tous les critères d'inclusion et d'exclusion. Les patients inclus ont été suivis pendant 28 jours avec des visites programmées aux Jours 3, 7, 14, 21 et 28.

Au jour 0, les patients inclus ont reçu ASAQ (Winthrop®, sanofi aventis) ou AL (Coartem®, Novartis) comme traitement. ASAQ a été administré en prise unique chaque jour pendant 3 jours à la dose standard comme suit: [4,5 - 9 Kg [1 comprimé 25/67,5 mg; [9-18 Kg [1 comprimé 50/135mg; [18-36Kg [1comprimé 100/270 mg; \geq 36Kg 2 comprimés 100/270 mg. AL a été administré deux fois par jour pendant trois jours selon le poids corporel comme suit: 5–14 kg, un comprimé 20/120 mg par prise; 15–24 kg, deux comprimés 20/120

mg par prise; 25–34 kg, trois comprimés 20/120 mg par prise et chez les adultes, quatre comprimés 20/120 mg par prise. Les prises du médicament n'ont pas été observées par les infirmiers de l'étude. La période de prise et les modes d'administration des trois jours de traitement ont été expliqués aux patients ou leurs parents / tuteurs qui l'ont effectué en ambulatoire à domicile. Les patients qui avaient une goutte épaisse positive mais qui ne répondaient pas aux critères d'inclusion ont été traités avec ASAQ (seule combinaison disponible dans les dépôts pharmaceutiques des CSPS).

A chaque jour de visite et à toute visite non programmée, un examen clinique a été réalisé. L'histoire de la maladie, les différents symptômes ou effets adverses, les traitements antérieurs et concomitants ont été notifiés et consignés dans un formulaire de report des cas (CRF) individuel pour chaque participant. Un prélèvement sanguin au bout du doigt a été effectué pour la réalisation d'une goutte épaisse/frottis mince, la mesure du taux d'hémoglobine et la confection de confettis sur du papier Whatman pour des analyses PCR.

Le tableau I ci-dessous résume les principales activités réalisées à chaque jour de visite durant la période de suivi:

Tableau I: Programme et activités menées au cours du suivi de 28 jours des participants à l'étude

Activités	J0	J3	J7	J14	J21	J28	VNP
Consentement éclairé	X						
Histoire de la maladie (Symptômes)	X						
Critères d'inclusion	X						
Examen clinique	X	X	X	X	X	X	X
Goutte épaisse / Frottis	X	X	X	X	X	X	X
Taux d'hémoglobine	X	X	X	X	X	X	X
Confettis	X	X	X	X	X	X	X
Effets adverses	X	X	X	X	X	X	X
Administration du traitement	X						
Traitement concomitant	X	X	X	X	X	X	X

J: Jour

VNP: Visite Non Programmée

4. Examens microscopiques des lames de goutte épaisse et de frottis mince

Les lames colorées au Giemsa dilué à 3% (pendant 30 minutes) ont été lues en double par des microscopistes qualifiés (Barcia, 2007). En cas de discordance, un troisième lecteur intervenait pour départager les deux premiers lecteurs. Les cas de discordance étaient définis comme suit: (i) lorsque l'un des lecteurs avait un résultat négatif contre un résultat positif pour l'autre, (ii) pour les fortes parasitemies (≥ 400 formes asexuées/ μL de sang), lorsque le ratio de la densité parasitaire (DP) la plus élevée/ à la DP la plus faible était ≥ 1.5 , (iii) pour les faibles parasitemie, lorsque la différence entre les deux lectures dépassait 10 logarithmes, (iv) lorsqu'une différence était constatée au niveau des espèces plasmodiales. Un résultat était déclaré négatif lorsqu'aucun parasite n'était détecté après avoir parcouru 100 champs microscopiques. La formule standard basée sur le ratio de 8000 globules blancs/ μl de sang a été considérée pour l'estimation de la densité parasitaire à partir de la GE comme suit:

$$DP = \frac{n \times 8000}{N}$$

n = nombre de parasites (formes asexuées) rencontrés

N = nombre de leucocytes rencontrés

A partir du premier champ microscopique positif, si le nombre de parasites comptés était supérieur à 100 par champ microscopique, la densité parasitaire était calculée à partir du frottis mince. En estimant à 200 en moyenne le nombre de globules blancs par champ microscopique et à 4000000 le nombre d'hématie par microlitre de sang, la densité parasitaire était calculée selon la formule suivante :

$$DP = \frac{\text{Nombre de GRP} \times 4000000}{\text{Nombre de champs examinés} \times 200}$$

5. Critères d'évaluation de l'efficacité thérapeutiques et de la tolérance des deux traitements

L'efficacité thérapeutique des deux traitements a été évaluée selon le protocole de l'OMS version 2003 (WHO, 2003a). Les critères primaires d'évaluation étaient définis comme suit:

- Echec Thérapeutique Précoce (ETP): il était défini de la façon suivante: (i) développement de signes de danger ou de paludisme grave au jour 0, 1, 2 ou 3 en présence de parasitémie; (ii) parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0 indépendamment de la température axillaire; (iii) parasitémie au jour 3 associée à une fièvre (température axillaire ≥ 37.5); (iv) parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ de celle du jour 0.
- Echec Thérapeutique Tardif (ETT) subdivisé en:
 - Echec Clinique Tardif (ECT): (i) développement de signe de danger ou de paludisme grave après le jour 3 associé à une parasitémie; (ii) toute fièvre associée à une parasitémie sans que les critères de l'ETP ne soient remplis au préalable.

- Echec Parasitologique Tardif (EPT): ce critère était défini comme étant la présence d'une parasitémie après le jour 3 sans fièvre (température axillaire < 37°5) et sans que les critères de l'ETP et ECT ne soient remplis.

➤ Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA): il était défini comme étant l'absence de parasitémie à l'issue des 28 jours de suivi et sans que les critères ci-dessus cités ne soient remplis.

L'Echec Thérapeutique Global (ETG) était défini comme étant la somme de tous les échecs thérapeutiques (ETP, ECT et EPT).

Les critères secondaires d'évaluation ont concerné la tolérance (survenue d'effets adverses (EA) à l'issue du traitement), le risque de nouvelles infections et le portage des gamétocytes.

Un EA était défini comme étant la survenue de tout événement médical fâcheux chez un patient ou un sujet au cours d'une investigation et à qui un produit pharmaceutique est administré et qui n'a pas nécessairement un rapport de causalité avec ce traitement. Un EA peut de ce fait être tout signe défavorable et inattendu (qui pourrait inclure un résultat de laboratoire anormal et cliniquement significatif), des symptômes ou une maladie temporairement associée à l'utilisation d'un produit pharmaceutique, qu'il soit considéré comme lié ou non au produit pharmaceutique (WHO, 1992, Edwards and Aronson, 2000).

Les effets adverses étaient non seulement rapportés par les patients (adultes), parents / tuteurs mais aussi détectés au cours des examens réalisés aux patients. L'intensité des EA étaient déterminées après une étude minutieuse de l'histoire de l'évènement par le médecin et ils étaient ensuite classés selon un algorithme de classification des EA proposé par l'OMS (Annexe 3). La relation entre un effet adverse et le médicament était également évaluée après une étude minutieuse de l'effet par le médecin selon les définitions suivantes (Meyboom and Royer, 1992, Edwards and Aronson, 2000):

(i) Sans rapport absolu: Evènements qui se produisent avant l'administration du médicament de l'essai (par exemple, lavage ou placebo simple-aveugle) ou pour les évènements qui ne

peuvent pas, même à distance être liés à la participation à l'étude (par exemple dommages provoqués par un tiers).

(ii) Peu probable: Il n'y a aucune association temporelle raisonnable entre le médicament de l'étude et l'évènement suspecté pourrait avoir été produit par l'état clinique du sujet ou d'autres types de thérapie administrés au sujet.

(iii) Possible: L'évènement défavorable suspecté peut ou peut ne pas suivre une séquence temporelle raisonnable à partir de l'administration du médicament de l'étude mais semble être le type de réaction qui ne peut pas être écarté comme improbable. L'évènement pourrait avoir été produit par l'état clinique du sujet ou par d'autres modes de thérapie concomitamment administrés au sujet.

(iv) Probable: L'évènement défavorable suspecté suit une séquence temporelle raisonnable à partir de l'administration du médicament de l'étude, diminue lors de la discontinuation du médicament, et ne peut être raisonnablement expliqué par les caractéristiques connues de l'état clinique du sujet

(v) Absolument lié: Evènement qui n'ont aucune incertitude dans leur rapport avec l'administration du médicament d'essai.

6. Analyses moléculaires

6.1. Extraction de l'ADN

L'ADN plasmodial a été extrait à partir des échantillons de sang séchés sur papier Whatman (Confettis) par la méthode du QIamp DNA miniKit (Qiagen, Germany) selon les instructions du fabricant. Les détails de la procédure d'extraction sont résumés en annexe 3. Les extraits d'ADN ont été ensuite conservés à -20°C pour une analyse ultérieure.

6.2. Amplification de l'ADN du bloc 2 de *msp1* et du bloc 3 de *msp2*

Pour l'amplification de l'ADN, nous avons utilisé une technique de PCR nichée. Elle a consisté en une première amplification ciblant un domaine plus large du bloc 2 de *msp1* et

celui du bloc 3 de *msp2* suivie d'une seconde amplification plus spécifique. Les programmes d'amplification et les séquences des amorces utilisées sont consignés dans le tableau II ci-dessous:

Tableau II: Programme d'amplification et séquence des amorces utilisées pour les génotypage de *msp1* et *msp2*

Gènes et étapes de la PCR	Amorces (5.....3')	Programme d'amplification
PCR multiplex <i>msp</i>	<i>M1OF</i> :CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG <i>M1OR</i> :CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA <i>M2OF</i> :ATGAAGGTAATTTAAAACATTGTCTATTATA <i>M2OR</i> : CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT	94°C x 5 min 36 x (94°C x1 min, 58°Cx2 min, 72°C x2 min), 72°C x 10 min, Garder à 15°C
2 ^e round <i>msp1</i>	<i>MIKF</i> :AAATAGAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC <i>MIKR</i> : GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA <i>MIMF</i> :AAATGAAGGAACAAGTGAACAGCTGTTAC <i>MIMR</i> : ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC <i>MIRF</i> : TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG <i>RO33RV</i> :TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG	94°C x 5 min 30 x (94°C x1 min, 59°Cx2 min, 72°C x2 min), 72°C x 10 min, Garder à 15°C
2 ^e round <i>msp2</i>	<i>S1</i> : 7bpTail-GCTTATAATATGAGTATAAGGAGAA <i>N5</i> : VIC-CTGAAGAGGTACTGGTAGA <i>M5</i> : 6FAM-GCATTGCCAGAACTTGAA	94°C x 5 min 40 x (94°C x1 sec, 58°Cx45 sec, 72°C x1,5 min), 72°C x 10 min, Garder à 15°C

Cinq microlitres d'extrait d'ADN servant de matrice ont été utilisés pour lancer la première PCR multiplex *msp*. Un microlitre du produit d'amplification du premier round est utilisé comme ADN matrice pour lancer les 2nd rounds de PCR nichée *msp1* et *msp2*. Toutes les PCR se sont réalisées à un volume total de 25 µl comme l'indique le tableau III:

Tableau II: Composition des mélanges de la PCR pour le génotypage de *msp1* et *msp2*

Réactifs	PCR 1		PCR 2	
	Concentrations	Volumes (µL)	Concentrations	Volumes (µL)
H ₂ O ultra pure	-	12,5		15,35
Amorce sens	10 µM	0,1	10 µM	0,5
Amorce Antisens	10 µM	0,1	10 µM	0,5
Buffer	10X	5	10X	5
dNTPs	5 mM	0,6	2 mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,5	25 mM	1,5
Taq polymérase	5 U/µL	0,2	5 U/µL	0,15
Extrait d'ADN	Inconnue	5	inconnue	1
Volume final =			25 µL	

6.3 Révélation des bandes d'ADN

La révélation des bandes d'ADN a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose préparé à 2% et contenant du bromure d'éthidium. Cette technique est basée sur le principe que les fragments d'ADN peuvent être séparés par des champs électriques. En faisant migrer l'ADN à travers le gel d'agarose, les fragments se séparent en fonction de leur taille. Le bromure d'éthidium qui a la propriété de s'intercaler entre les bases permet ainsi de visualiser les fragments d'ADN aux UV.

L'interprétation des résultats a été faite de la façon suivante. La première étape a consisté en une validation des résultats de la PCR. Les résultats ont été considérés comme valides s'il y avait: (i) Apparition de la bande du contrôle positif confirmant alors sa positivité; (ii) Absence de bandes au niveau du contrôle négatif; (iii) Absence de bandes au niveau du mélange réactionnel (Mix). Les photos des gels pour lesquels les résultats étaient valides (annexes 4) ont été ensuite scannées puis analysées à l'aide du logiciel Photo CaptM^w (version 11.01). Ce dernier permet de détecter et de calculer la taille des différents fragments par

rapport à la référence qui était un marqueur de poids moléculaire de 100Pb (Thermo Scientific Fermentas®).

7. Traitement et analyse des données

Au cours de la phase clinique, toutes les données collectées sur chaque participant ont été consignées dans le formulaire de report des cas (CRF). Les CRF ont été saisis en double par deux agents de saisi indépendants à l'aide du logiciel ACCESS. Un système de vérification a été utilisé pour détecter les erreurs de saisi qui ont été corrigées en se référant au document source (CRF). Les données moléculaires ont été enregistrées indépendamment des données cliniques dans une base Excel. Le logiciel STATA (IC) version 10.0 a été utilisé pour les analyses statistiques. Les différences entre groupes ont été déterminées par le test de Chi-carré et l'analyse des variances (ANOVA) pour les variables continues normalement distribuées. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les variables continues dont la distribution n'était pas normale. Les risques de recrudescences et de nouvelles infections (NI) ont été déterminés par des courbes de Kaplan-Meier. Les différences observées étaient considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de $p \leq 0,05$.

8. Considération éthique

Comme mentionné plus haut, cette étude est l'un des volets d'une grande étude intitulée «Pharmacovigilance des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine en Afrique». L'étude s'est déroulée dans le respect des règles d'éthique, de bonnes pratiques cliniques (GCP) et de bonnes pratiques de laboratoire (GLP). Avant l'enrôlement, un consentement écrit, libre et éclairé du patient ou des parents / tuteurs pour les mineurs a été obtenu. Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité d'éthique institutionnel du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso, le comité national d'éthique pour la recherche en santé du Burkina Faso et le comité d'éthique de l'OMS-TDR.

III. Résultats

Au cours de la période d'étude, 1480 patients fébriles ou présentant une histoire de fièvre des 24 heures précédentes ont été enrôlés sur l'ensemble des deux sites de collecte. La recherche d'hématozoaires du genre *Plasmodium* était positive dans 1010 frottis sanguins, soit 68,2% des cas. Les mono infections par *P. falciparum* ont été retrouvées dans 97% (980/1010) des cas. Les autres espèces rencontrées, le plus souvent en association avec *P. falciparum* étaient *P. malariae* dans 2% des cas (n=21) et *P. ovale* dans 0,9% des cas (n=9).

Parmi les cas de paludisme à *P. falciparum*, 680 patients répondaient aux critères d'inclusion pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Ces patients ont été randomisés de sorte à recevoir soit ASAQ (n=340) ou AL (n= 340) comme traitement et ont été ensuite suivi pendant 28 jours. Quatre cent quatre-vingt-seize (496) participants (75,1%) de la population d'étude étaient constitués par des enfants de moins de cinq ans contre 164 (24,8%) patients âgés de plus de cinq ans. La figure 12 résume les différentes étapes de sélection des sujets et indique le flux des participants de l'étude depuis le processus de sélection jusqu'à la fin des 28 jours de suivi.

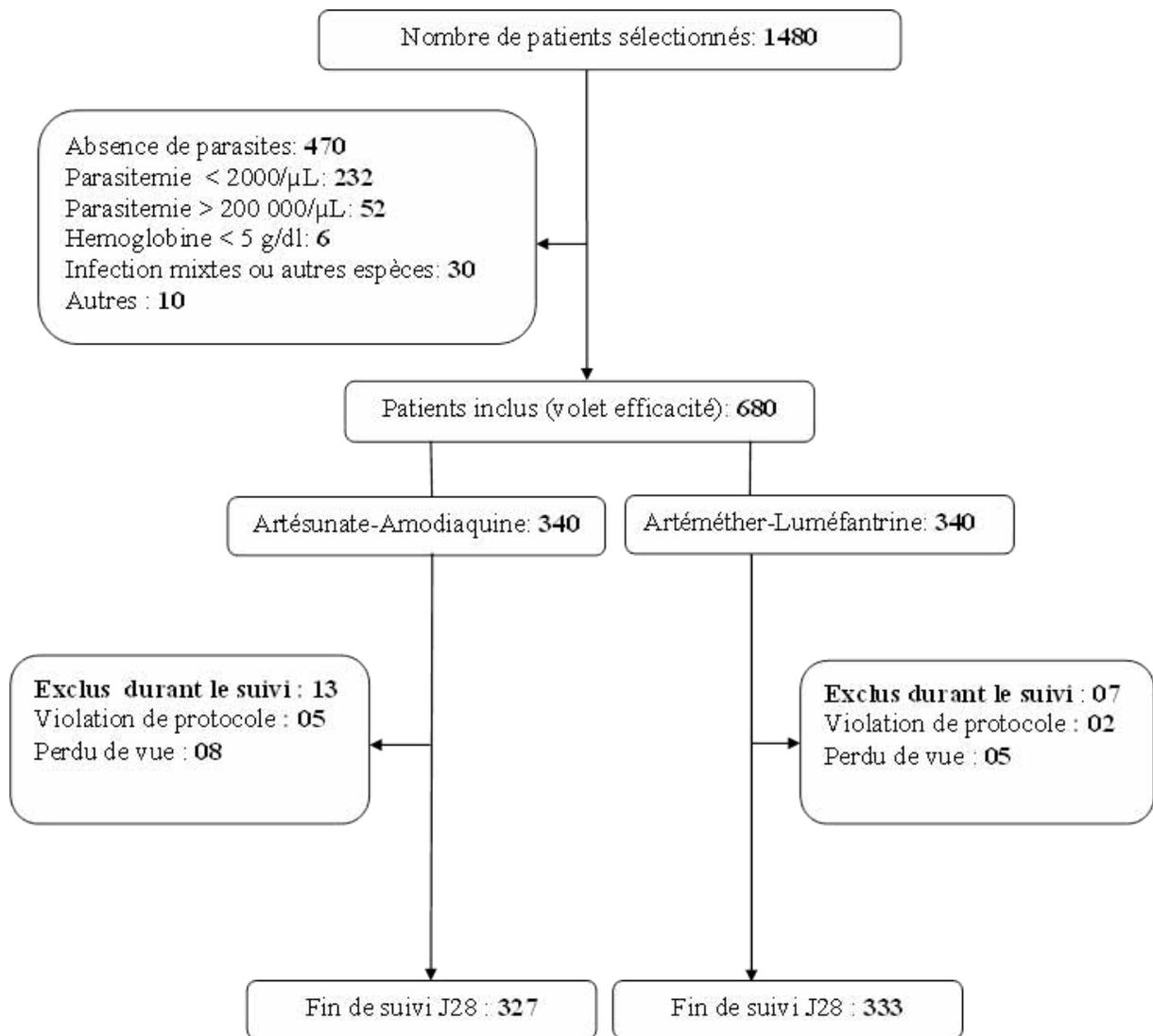


Figure 12: Flux des participants depuis la sélection jusqu'à la fin du suivi de 28 jours

1. Les caractéristiques de la population à l'inclusion

Le tableau IV présente les caractéristiques de la population par bras de traitement à l'inclusion. Les caractéristiques étaient semblables dans les deux groupes de traitement, exception faite du taux d'hémoglobine qui était significativement plus élevé dans le bras AL par rapport au bras ASAQ ($p=0,0176$).

Tableau IV: Caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques de la population à l'inclusion

Caractéristique		AL	ASAQ	p- value
		n=340	n=340	
Site	Nanoro n (%)	176 (51,76)	176 (51,76)	-
	Nazoanga n (%)	164 (48,24)	164 (48,24)	
Sexe	Masculin n (%)	183 (53,82)	182(53,53)	0,939
	Féminin n (%)	157 (46,18)	158 (46,47)	
Age médian en année (p25 - p75)		3.26 (1,70– 4,98)	3.14 (1,61– 5,05)	0,387
Poids moyen en Kg (range)		14,21 (9,85)	13,27 (8,99)	0,196
Température moyenne (écart type)		38,41 (0,91)	38,47 (0,91)	0,381
Hémoglobine moyen (écart type)		9,23 (2,09)	8,86 (1,93)	0,0176
Moyenne géométrique de la DP (95%IC)		30529,56 (26809,09 34766,34)	30762,83 – (27179,66 34818,37)	0,933 –
Taux de portage des gamétocytes n (%)		21(6,18)	24(7,06)	0,644

2. Efficacité thérapeutique à l'issu des 28 jours de suivi

Le tableau V résume les résultats des critères d'évaluation primaires de la réponse au traitement. A l'issu des 28 jours de suivi, la Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate (RCPA) était significativement plus élevée dans le bras ASAQ comparativement au bras AL avant et après correction par PCR. Avant correction par PCR, elle était de 67,0% dans le groupe de ASAQ contre 47,7% dans le groupe AL [Différence de Risque=-0,19 95% IC (-26,62-11,81) p<0,00001]. Après correction par la PCR, elle était de 84,1% et de 77,8% dans le bras ASAQ *et al* respectivement [Différence de Risque =-6,32 95% IC (-12,29-0,34) p=0,0389].

Tableau V: Résultats de l'évaluation de l'efficacité du traitement par bras

Réponse au Traitement	AL	ASAQ	Différence de risque	p- value
	n=333 (%)	n=327 (%)	(95% IC)	
Non corrigé par PCR				
RCPA	159 (47,8)	219 (67,0)	-0,19 (-26,62-11,81)	<0,00001
ETG	174 (52,2)	108 (43,0)		
ETP	2(0,6)	3 (0,9)		
ECT	47(14,1)	18 (5,5)		
EPT	125(37,5)	87 (26,6)		
Corrigé par PCR				
RCPA	259 (77,8)	275 (84,1)	-6,32 (-12,29 -0,34)	0,0389
ETG	74 (22,2)	52 (15,9)		
ETP	2 (0,6)	3 (0,9)		
ECT	22 (6,6)	11(3,4)		
EPT	50 (15,0)	38 (11,6)		

Lorsqu'on stratifie la réponse au traitement en fonction de la tranche d'âge (Tableau VI), une meilleure efficacité chez les participants plus âgés (>5 ans) que chez les enfants de moins de cinq ans était observée.

Tableau VI: Réponse au traitement par tranche d'âge

Traitement	Réponse au traitement	≤5 ans	>5 ans	p-value
		n=496 (%)	n=164 (%)	
AL	Non corrigée par PCR			
	RCPA	109 (43,3)	50 (61,7)	0,004
	ETG	143 (56,7)	31 (38,3)	
	Corrigée par PCR			
	RCPA	192 (76,2)	67 (82,7)	0,276
	ETG	60 (23,8)	14 (17,3)	
ASAQ	Non corrigée par PCR			
	RCPA	154 (63,1)	65 (78,3)	0,013
	ETG	90 (36,9)	18 (21,7)	
	Corrigée par PCR			
	RCPA	199 (81,6)	76 (91,6)	0,053
	ETG	45 (18,4)	(8,4)	

La figure 13 présente le risque de recrudescence par bras de traitement. Les recrudescences commençaient à s'observer après le jour 14 dans les deux groupes de traitement. Cependant, le risque de recrudescence était significativement plus élevé dans le bras AL comparativement au bras ASAQ (p=0,0059).

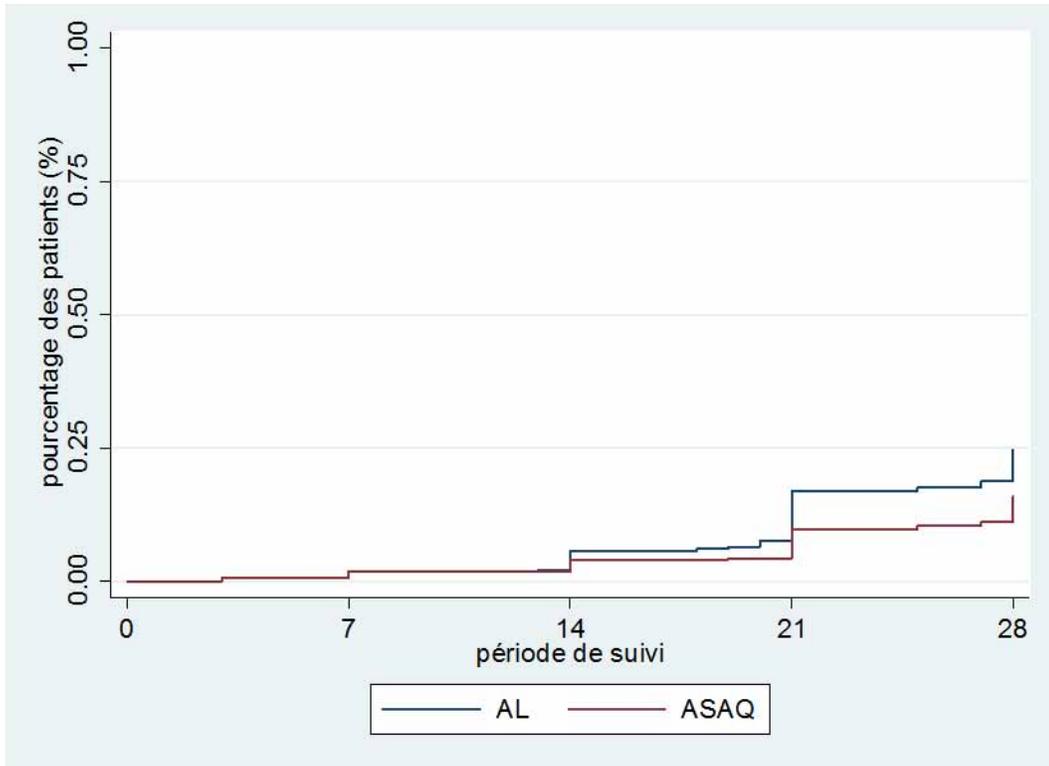


Figure 13: Risque de recrudescence par bras de traitement

La figure 14 présente le risque de nouvelles infections par bras de traitement au cours des 28 jours de suivi. Comme dans le cas des recrudescences, les nouvelles infections commençaient à apparaître à partir du jour 14 pour les deux traitements. Aussi, le risque était encore plus important dans le bras AL que dans le bras ASAQ.

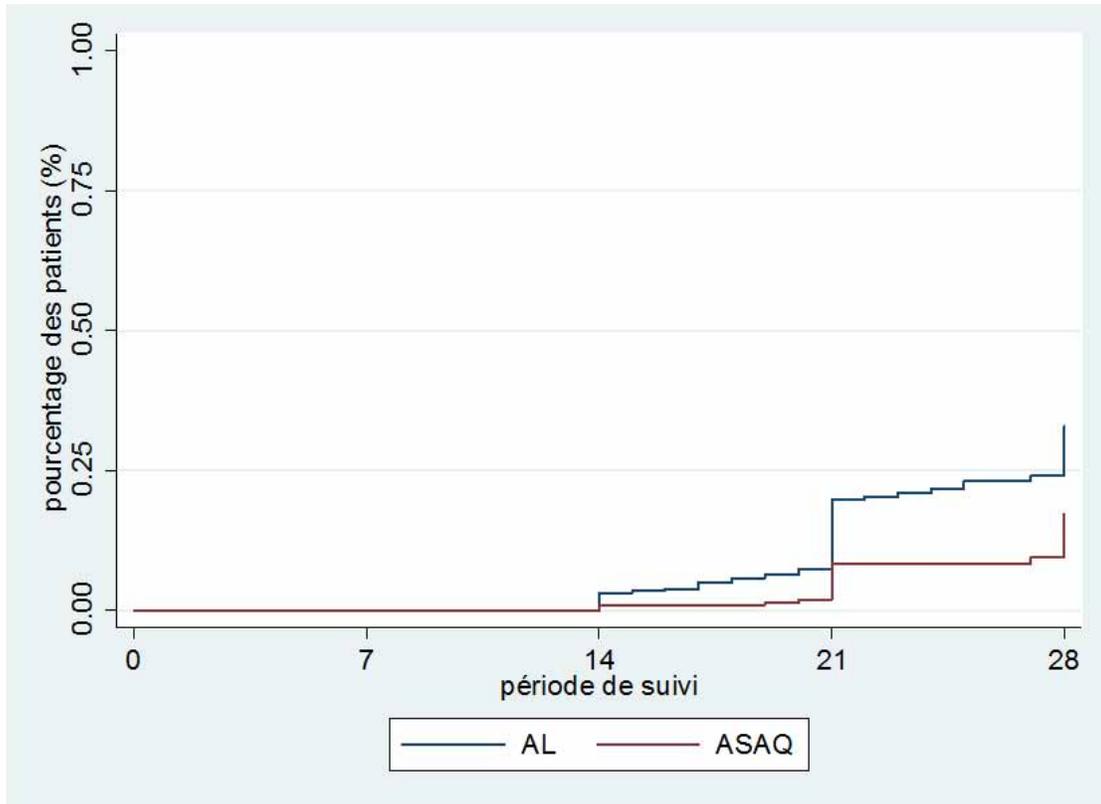


Figure 14: Risque de nouvelle infection par bras de traitement

3. L'influence de la saison sur l'efficacité des traitements

Le tableau VII montre les résultats de RCPA non corrigée par PCR (uRCPA) et après correction par PCR (aRCPA) en fonction de la saison. Nous avons constaté que la saisonnalité de la transmission du paludisme avait un grand impact sur l'efficacité des traitements. Sur l'ensemble des patients ayant reçu un traitement initial, plus de la moitié de la population a présenté un nouvel épisode palustre dans les 28 jours au cours de la saison pluvieuse.

Tableau VII: Réponse au traitement en fonction de la saison

Critère d'évaluation		Saison sèche	Saison pluvieuse	Différence de risque (95%IC)	p-value
AL	uRCPA n	65	94	38,57	<0,0001
	(%)	(76,5%)	(37,9%)	(27,71 – 49,42)	
	aRCPA n	73	188	10,07	0,051
	(%)	(85,9%)	(75,8%)	(0,9 – 19,19)	
ASAQ	uRCPA n	83	137	35,7	<0,0001
	(%)	(93,3%)	(57,6%)	(27,54 – 43,85)	
	aRCPA n	84	194	12,87	0,0037
	(%)	(94,4%)	(81,5%)	(5,99 – 19,74)	

La figure 15 montre la dynamique de la RCPA non corrigée par PCR pour chacun des deux groupes de traitement. Avant correction par PCR, la RCPA était meilleure entre Février et Mai alors qu'elle diminuait entre Juin et Août pour chacun des deux traitements.

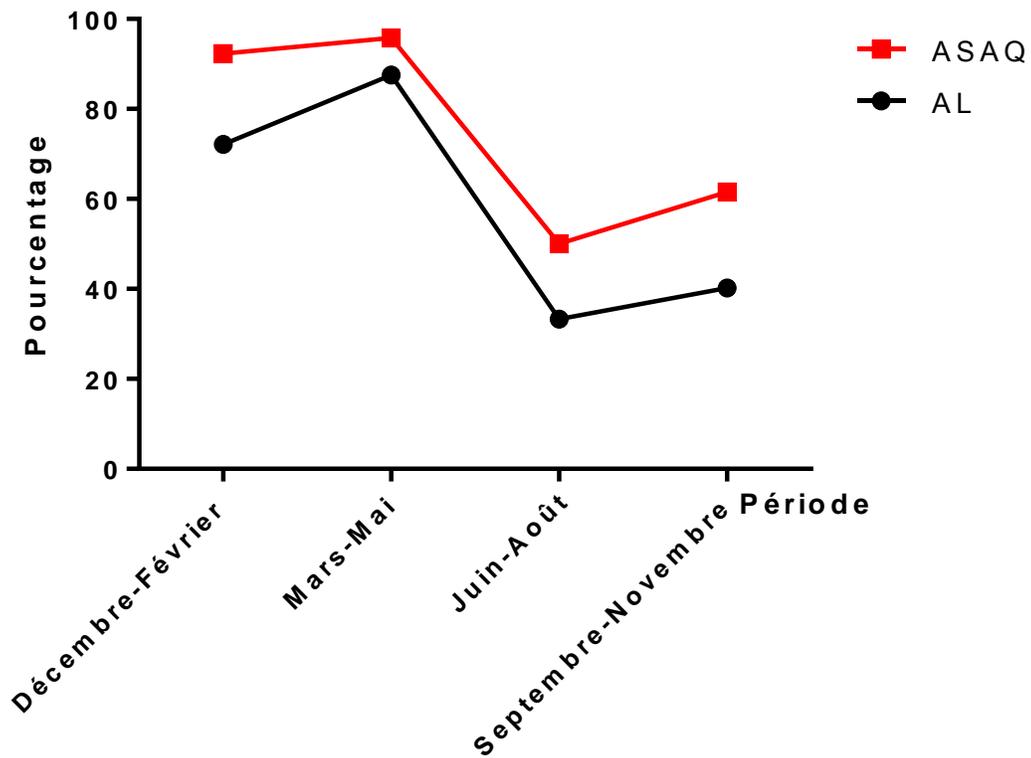


Figure 15: Fluctuation temporaire de la RCPA non corrigée par PCR par bras de traitement

Dans le même temps, une tendance similaire après ajustement par PCR était constatée (Figure 16). Cela montre que cette baisse n'est pas seulement due aux nouvelles infections mais qu'à cela s'ajoute une fréquence élevée de recrudescences au cours de cette période.

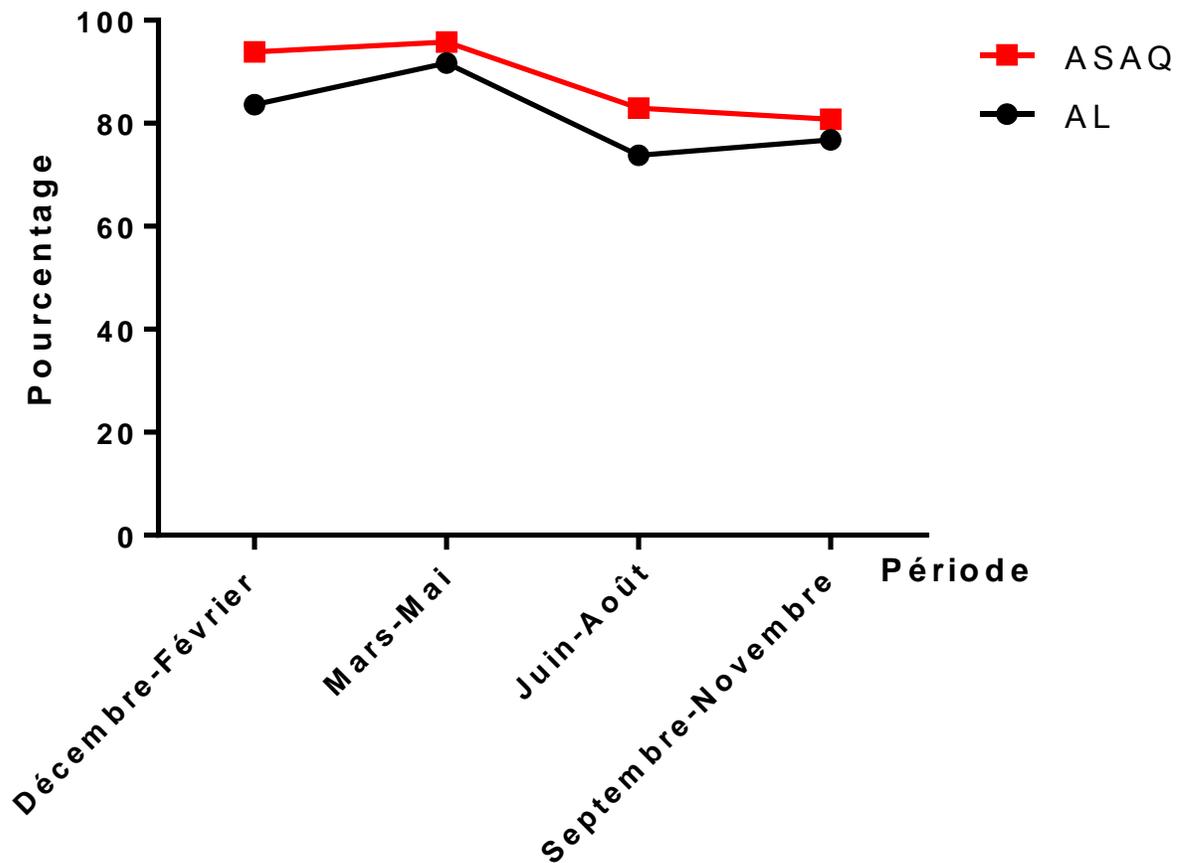


Figure 16: Fluctuation temporaire de la RCPA après correction par PCR par bras de traitement

4. Impact des deux traitements sur le portage des gamétocytes

L'impact du traitement sur le portage des gamétocytes a été exploré. La figure 17 montre l'évolution du taux de portage des gamétocytes par bras de traitement au cours du suivi.

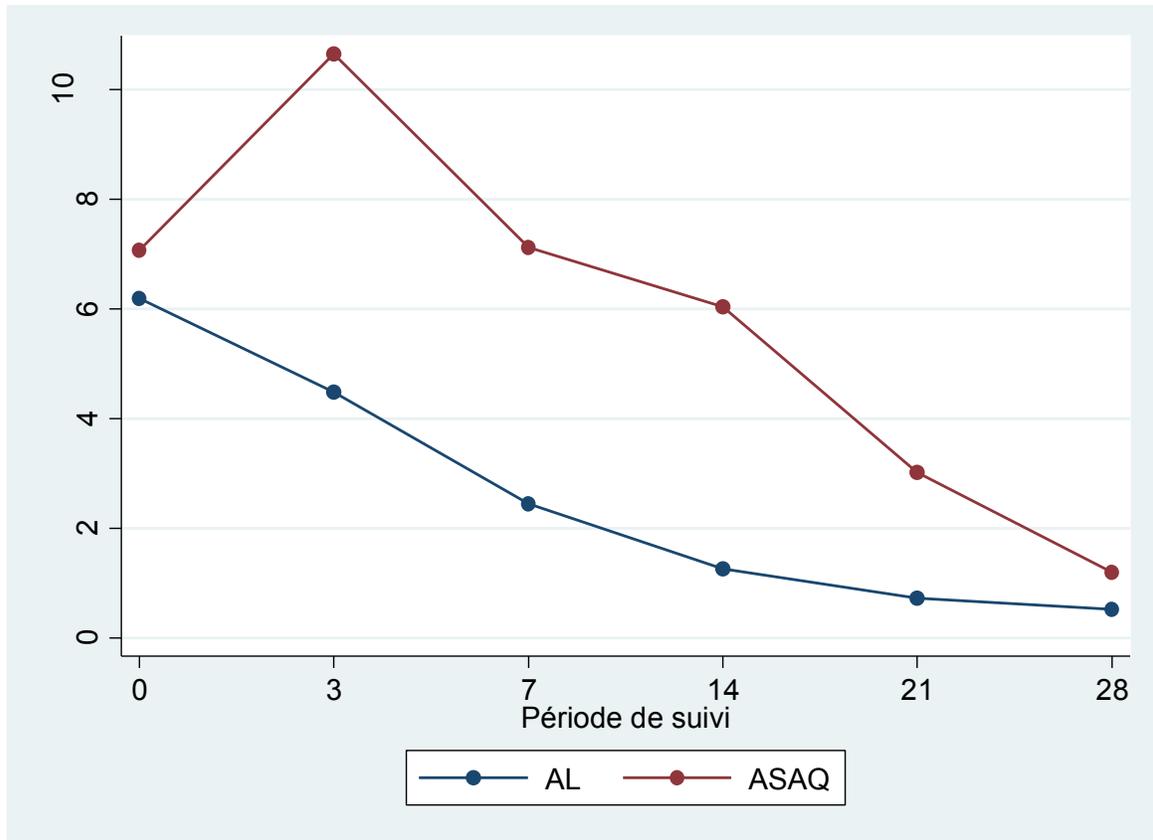


Figure 17: Evolution du taux de portage des gamétocytes par bras de traitement

Il ressort que les deux traitements ont un grand effet gamétocytocide post-thérapeutique. En effet, la vitesse d'élimination des gamétocytes était beaucoup plus rapide dans le bras AL que dans le bras ASAQ.

5. La tolérance des deux traitements

Le tableau VIII présente les résultats de tolérance dans les deux groupes de traitement. Tous les deux traitements ont été bien tolérés. Nous avons noté une moyenne de deux effets adverses par patients dans les deux bras. Les effets indésirables les plus couramment observés dans chacun des deux groupes de traitement étaient: la fièvre (n=117/83), la toux (n=75/74), la diarrhée (n=61/65), les rhinites (n=19/20), l'anémie (n=17/17), les vomissements (n=11/20), les douleurs abdominales (n=15/11), l'anorexie (n=9/12), les conjonctivites (n=6/10), les otites (n=9/5), les céphalées (n=7/7) et les prurits (n=5/3). Six effets indésirables graves

étaient notifiés dans le bras AL contre quatre dans le bras ASAQ. La plupart de ces effets indésirables graves n'avaient absolument pas de rapport avec les traitements administrés.

Tableau VIII: Résultats de tolérance par bras de traitement

Traitement		AL	ASAQ	p-value
		n=193	n=188	
Nombre total des effets adverses (EA)		386	346	-
Moyennes des EA par patient		2	1,8	0,20
Sévérité des effets adverses (%)	Légère	83,4	84,7	0,642
	Modérée	13,7	13,9	0,956
	Grave	2,9	1,4	0,382
Relation avec le traitement (%)	Absolument pas lié	29,5	30,3	0,810
	Peu probable	54,2	55,2	0,774
	Possible	12,7	10,7	0,401
	Probable	3,6	3,8	0,926
	Etroitement lié	0	0	-

Sur le plan biologique, nous avons évalué la tolérance à travers les examens réalisés, en l'occurrence la mesure du taux d'hémoglobine. La figure 18 montre l'évolution du taux d'hémoglobine par bras de traitement au cours des 28 jours de suivi.

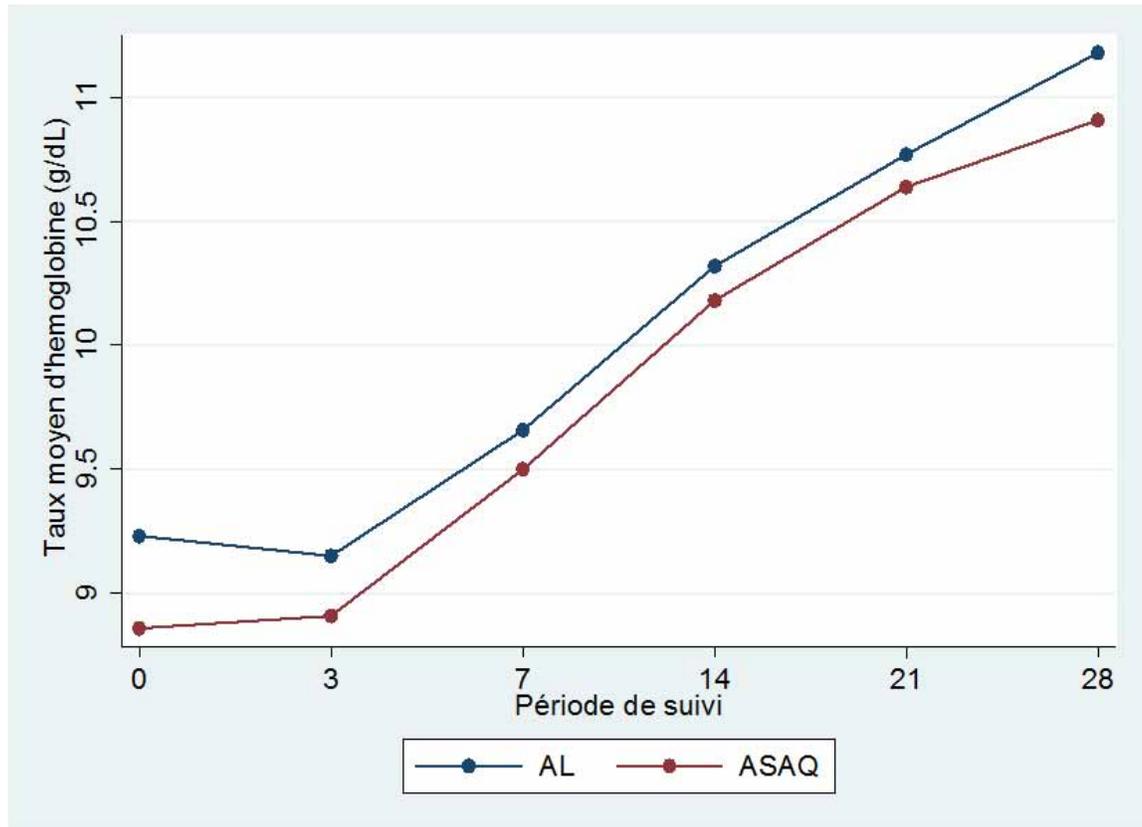


Figure 18: Evolution du taux d'hémoglobine par bras de traitement

La figure montre une augmentation progressive du taux d'hémoglobine après la prise du médicament dans les deux bras de traitement.

IV. Discussion

Bien que l'efficacité des CTA rapportée par les essais cliniques classiques soit bonne, les conditions dans lesquelles ces études se déroulent ne reflètent pas toujours la réalité sur le terrain. De ce fait, l'évaluation de l'efficacité de ces médicaments sans une supervision de la prise des traitements est importante dans un contexte où la prise en charge du paludisme à domicile par les agents de santé communautaire constitue une composante majeure de la politique nationale de lutte contre le paludisme.

Cette étude montre que le taux de guérison après correction par PCR était de 77,8% et 84,1% pour AL et ASAQ respectivement. Cela indique qu'il y a une baisse du taux de

guérison quand les prises du médicament ne sont pas supervisées directement par les agents de santé. Des résultats similaires avaient été rapportés dans une étude conduite au Gabon sur les enfants (Oyakhirome *et al.*, 2007). Une autre étude conduite dans la même zone et qui ne supervisait pas, elle aussi, la prise des traitements a rapporté une efficacité de 89,7% pour AL et 89,8% pour ASAQ après un suivi de 42 jours (Tinto *et al.*, 2014b). Cependant, quand les prises du médicament sont directement observées par le personnel de santé, des taux d'efficacité de plus de 90% ont toujours été rapportés (Zongo *et al.*, 2007a, Ndiaye *et al.*, 2009, Yavo *et al.*, 2015). Tout cela montre que dans les conditions réelles d'utilisation, il y a une baisse d'efficacité des CTA, comparativement à ce qui est rapporté dans les essais cliniques classiques.

Toutefois, comme dans notre étude les prises du médicament n'étaient pas supervisées et que l'évaluation de l'observance était uniquement basée sur ce que le patient rapportait au jour 3, le faible taux de guérison observé est à relativiser. Cela constitue en fait une des limites de notre étude car d'autres auteurs ont montré une différence d'observance selon les méthodes d'évaluation utilisées et que la méthode basée sur le rapport du patient semble ne pas être la plus appropriée (Adams *et al.*, 1999, Bell *et al.*, 2009). Ainsi, l'observance du traitement et surtout le fait qu'il est recommandé d'administrer AL avec des aliments gras (ce qui n'est pas toujours respecté dans les conditions réelles d'utilisation) sont des paramètres qui pourraient expliquer ce faible taux de guérison. En effet dans ces conditions, il pourrait y avoir un problème d'absorption de la Luméfantrine avec une réduction de sa concentration plasmatique, augmentant ainsi les risques de réinfections (White *et al.*, 1999). De plus, les vomissements étaient classés parmi les effets indésirables les plus fréquemment observés. Dans les conditions de cette étude, il était difficile de connaître avec précision le temps écoulé entre la prise du médicament et la survenue des vomissements et cela pouvait aussi affecter la réponse au traitement, surtout si les vomissements se produisaient aussitôt après la prise du traitement.

Une étude *ex-vivo* conduite dans la même zone a montré une diminution de la sensibilité de la Luméfantrine et cela pourrait aussi justifier ce faible taux d'efficacité d'AL qui résulte d'une combinaison entre l'Artéméther et la Luméfantrine (Tinto *et al.*, 2014a). Une étude conduite au Kenya a montré une diminution de la sensibilité des CTA en l'occurrence AL et la

Dihydroartémisinine-Pipéraquline (Borrmann *et al.*, 2011). Il est maintenant évident que des cas de résistance à l'Artémisinine ont été retrouvés en Asie du Sud-Est et pour cela, des précautions doivent être prises pour empêcher la propagation de cette résistance qui pourrait atteindre l'Afrique (Phyo *et al.*, 2012).

Un aspect novateur de cette étude était l'enrôlement des participants de tous les groupes d'âges alors que la plupart des études d'efficacité se limitaient généralement aux enfants de moins de cinq ans. L'efficacité de chacun des deux traitements était nettement meilleure chez les patients âgés que chez les enfants de moins de cinq ans. Cela n'est pas surprenant du fait de l'effet additif de la prémunition qu'acquière les sujets âgés vivant en zone d'endémie après des expositions répétées aux piqûres infectantes d'anophèles (Ladeia-Andrade *et al.*, 2009).

La présente étude montre qu'à l'issue des 28 jours de suivi, plus de 50% des patients traités présentaient un nouvel épisode palustre, avec un risque beaucoup plus élevé dans le groupe AL que dans le groupe ASAQ. La majorité d'entre eux était infesté par un nouveau clone du parasite. Ce phénomène augmente considérablement les coûts alloués à la lutte contre la maladie. En effet, une étude conduite au Ghana a montré que l'incidence de la parasitémie passe de 4,7/personne/an durant la période de faible transmission à 7,1 au cours de la période de forte transmission (Baird *et al.*, 2002). Dans un tel contexte, l'utilisation d'un médicament avec une demi-vie plus longue serait plus bénéfique. Cela sera d'autant plus intéressant en saison pluvieuse, vu que c'est au cours de cette période de forte transmission que l'efficacité des traitements actuellement utilisés est faible comme nous l'avons rapporté dans notre étude. Aussi, la mise en œuvre de la CPS permettra sans doute de réduire considérablement la transmission de la maladie.

Les deux traitements ont montré chacun un effet gamétocytocide post-thérapeutique. Cette réduction du taux de portage des gamétocytes s'effectuait beaucoup plus rapidement dans le bras AL que dans le bras ASAQ. En plus de l'effet curatif, l'impact de ces traitements sur les gamétocytes constitue un avantage fondamental car cela permet de réduire la transmission du paludisme dans les zones où ils sont déployés (Price *et al.*, 1996).

Les deux traitements étaient bien tolérés. En effet, les effets adverses notifiés étaient pour la plupart mineurs et n'avaient pas de rapport avec les traitements administrés. Après la prise du médicament, une augmentation du taux d'hémoglobine était observée dans les deux bras. Cette bonne tolérance avait été aussi rapportée par d'autres études (Meremikwu *et al.*, 2006, Brasseur *et al.*, 2012). Une des limites de cette étude relative à la tolérance des traitements, était l'incapacité des jeunes enfants à rapporter les effets indésirables alors qu'ils représentaient une proportion importante de notre population d'étude.

Conclusion

Il ressort de cette étude que dans les conditions réelles d'utilisation, une baisse significative du taux d'efficacité des CTA est observée, comparativement à ce qui est rapporté lors des essais cliniques classiques. Avec des taux de guérison de 77,8% pour AL et 84,1% pour ASAQ, nettement en deçà du seuil critique de 90% fixé par l'OMS, nos données soulèvent beaucoup d'inquiétudes, qui rendent nécessaire la conduite d'autres études similaires pour confirmer les résultats de cette étude.

Sur l'ensemble des patients ayant reçu un traitement initial, plus de la moitié ont présenté un nouvel épisode palustre dans les 28 jours au cours de la saison pluvieuse. La plupart des patients étaient infestés par de nouvelles souches, c'est-à-dire génétiquement différentes des souches présentes initialement. Eu égard à cette diversité des populations parasitaires hébergées par les patients, nous avons émis l'hypothèse que certaines souches pourraient être beaucoup plus associées à des signes particuliers de la maladie. Cet aspect a été exploré au cours de cette étude et le chapitre suivant traite de la relation entre ce polymorphisme du parasite et la symptomatologie du paludisme.

Chapitre 4: Relation entre la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et la symptomatologie du paludisme chez les humains

I. Introduction

Parmi les hématozoaires du genre *Plasmodium* pouvant parasiter l'homme, l'espèce *P. falciparum* est la plus fréquente et la plus dangereuse (incriminée dans plus de 90% de la mortalité palustre) (WHO, 2015b). Cependant, c'est une espèce extrêmement polymorphe et les habitants des zones d'endémie palustre sont couramment infestés par plusieurs clones parasites à la fois (Lord *et al.*, 1999). Cette diversité génétique du parasite est l'un des principaux facteurs responsable de l'acquisition lente (après plusieurs années) d'une prémunition contre le paludisme. Ainsi, les individus doivent rencontrer l'ensemble du répertoire antigénique des diverses souches circulant dans la zone avant de développer une protection immunitaire efficace contre la maladie (Jeffery, 1966). Le polymorphisme du parasite constitue aussi un obstacle au processus d'élaboration d'un vaccin efficace contre la maladie (Takala and Plowe, 2009).

Au même moment, les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses avec l'absence de signes spécifiques. Cela constitue un défi pour le diagnostic clinique qui constitue jusque-là une pratique courante en Afrique, du faite des fréquentes ruptures des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) (Luxemburger *et al.*, 1998). Il est bien établi que le risque pour un individu de développer un signe clinique de l'infection dépend d'une interaction complexe entre le parasite et l'hôte humain (Marsh and Snow, 1997, Greenwood *et al.*, 1991). En considérant les facteurs liés au parasite, l'hypothèse de l'existence de souches plus virulentes que d'autres a été déjà évoquée par plusieurs auteurs (Gupta *et al.*, 1994, Ariey *et al.*, 2001). Dans le modèle animal, des différences notables de virulence et de pathogénicité entre les différentes souches parasites ont été observées (de Roode *et al.*, 2005, Mackinnon and Read, 1999). Cependant, le recours à cette stratégie pour distinguer les souches parasites n'est pas réalisable chez les humains pour des raisons d'éthique. Pour ce faire, nous avons émis l'hypothèse que certaines souches pourraient être associées à la sévérité de certains signes particuliers de la maladie.

Malgré l'existence de plusieurs marqueurs de polymorphisme, les protéines de surface du mérozoïte (*msp1* et *msp2*) sont les plus appropriés, du fait de leur implication dans l'invasion du globule rouge par le mérozoïte (Cowman and Crabb, 2006). Ces marqueurs de polymorphisme sont en effet les plus couramment utilisés pour distinguer les populations parasitaires (Ranford-Cartwright *et al.*, 1997, Mugittu *et al.*, 2006). Nous avons utilisé ces deux marqueurs dans le cadre de la présente étude pour établir la relation entre le polymorphisme du parasite et les signes du paludisme les plus couramment observés et objectivement mesurables tels que les fortes fièvres, les fortes parasitémies et les faibles valeurs de taux d'hémoglobine.

II. Matériel et Méthodes

Les échantillons de sang séchés sur papier Whatman (confettis) utilisés pour cette étude ont été collectés sur deux sites (Nanoro et Nazoanga) lors de la sélection des patients dans le cadre de l'étude "Pharmacovigilance des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine en Afrique". Ces patients ont été stratifiés en deux groupes: (i) ceux ayant pris part à l'évaluation de l'efficacité et la tolérance d'ASAQ *versus* AL qui représentaient le groupe des patients souffrant de paludisme simple et (ii) ceux exclus de ce volet pour paludisme grave, en se basant sur la densité parasitaire ($DP \geq 200000$ formes asexuées/ μ L) ou le taux d'hémoglobine ($Hb \leq 5$ g/dL).

Les données cliniques concernaient uniquement celles du jour 0 et ont été extraites des formulaires de report des cas.

Les familles alléliques de *msp1* et *msp2* ont été déterminées conjointement lors de l'étude du polymorphisme allélique de ces marqueurs tel que décrit précédemment pour la distinction des recrudescences et des nouvelles infections (voir chapitre 3). Un échantillon était considéré comme appartenant à une famille allélique donnée s'il y avait apparition d'au moins une bande suite à l'amplification de l'ADN de cet échantillon avec les amorces spécifiques de la famille en question. En cas d'absence de bande, l'échantillon était considéré comme n'étant pas de cette famille allélique.

La polyclonalité était définie par la présence de plus d'un allèle de *msp1* ou de *msp2* de *P. falciparum* dans un seul isolat. La fréquence des infections polyclonales était alors définie comme étant le rapport du nombre de patients portant plus d'un clone de *P. falciparum* sur le nombre total de sujets infestés. La multiplicité de l'infection (*MOI*) était définie comme étant le nombre moyen de génotypes parasitaires par isolat. La fréquence d'un allèle était définie comme étant le rapport du nombre de fragments de ce type sur le nombre total de fragments du *locus* obtenus avec les échantillons ayant une PCR positive (Snounou *et al.*, 1999).

Pour étudier la relation entre la présence d'une famille allélique donnée du gène *msp1* ou du gène *msp2* de *P. falciparum*, et les signes du paludisme, nous avons choisi trois paramètres clés, objectivement mesurables et qui représentent des traits caractéristiques de la maladie: la température corporelle, le taux d'hémoglobine et la parasitémie. Un modèle linéaire généralisé (GLM) a été utilisé pour évaluer l'effet du polymorphisme allélique de *msp1* et *msp2* sur ces paramètres. Une différence était considérée comme étant statistiquement significative pour une valeur de $p \leq 0,05$.

III. Résultats

Au cours de cette étude, les échantillons du jour 0 avec mono-infection par *P. falciparum* et $DP \geq 2000$ formes asexuées par μL et dont les confettis étaient disponibles ($n=727$) ont été considérés pour cette analyse. Un seul isolat présentait une PCR négative sur l'ensemble des deux gènes. Dans l'ensemble, 1720 et 1660 fragments ont été obtenus pour *msp1* et *msp2* respectivement. La multiplicité de l'infection (*MOI*) était de 2,3 pour *msp1* et 2,2 pour *msp2*. Les résultats de prévalence de chaque famille allélique par site de collecte sont consignés dans le tableau IX.

Tableau IX: Prévalence des familles alléliques de *msp1* et *msp2* par site de collecte

Gène	Famille allélique	Nanoro n=378	Nazoanga n=349	Total n=727	p-value
<i>msp1</i>	K1	51,3 (437/852)	51,1 (444/868)	51,2 (881/1720)	0,933
	MAD20	25,9 (221/852)	27,1 (235/868)	26,5 (456/1720)	0,572
	RO33	22,8 (194/852)	21,8 (189/868)	22,3 (383/1720)	0,901
<i>msp2</i>	3D7	57,7 (491/851)	58,0 (469/809)	57,8 (960/1660)	0,901
	FC27	42,3 (360/851)	42,0 (340/809)	42,2 (700/1660)	

Il ressort que tous les profils polymorphiques de *msp1* et de *msp2* de *P. falciparum* étaient représentés dans notre zone d'étude. Aucune différence de prévalence des allèles n'a été observée entre les deux sites de collecte. Il y avait une forte prédominance des familles K1 et 3D7 pour *msp1* et *msp2* respectivement.

La répartition des familles alléliques de chacun des deux gènes (*msp1* et *msp2*) selon les deux statuts cliniques (paludisme simple *versus* paludisme grave) est présentée dans le tableau X.

Tableau X: Prévalence des familles alléliques de *msp1* et *msp2* selon le statut clinique du paludisme

Marqueur de Polymorphisme	Famille allélique	Paludisme simple n= 675	Paludisme grave n=52	p-value
<i>msp1</i>	K1	51,41 (836/1626)	48,94 (46/94)	0,744
	MAD20	26,57(432/1626)	25,53 (24/94)	0,910
	RO33	22,02(358/1626)	25,53 (24/94)	0,688
<i>msp2</i>	3D7	57,41(891/1552)	63,89(69/108)	0,293
	FC27	42,59 (661/1552)	36,11 (39/108)	0,425

Aucune différence statistiquement significative des prévalences des familles alléliques de chacun des deux gènes n'a été observée entre les deux entités cliniques de la maladie ($p > 0,05$).

1. La densité parasitaire

La relation entre la variabilité allélique de *msp1* et de *msp2* et la parasitémie est représentée dans la figure 19.

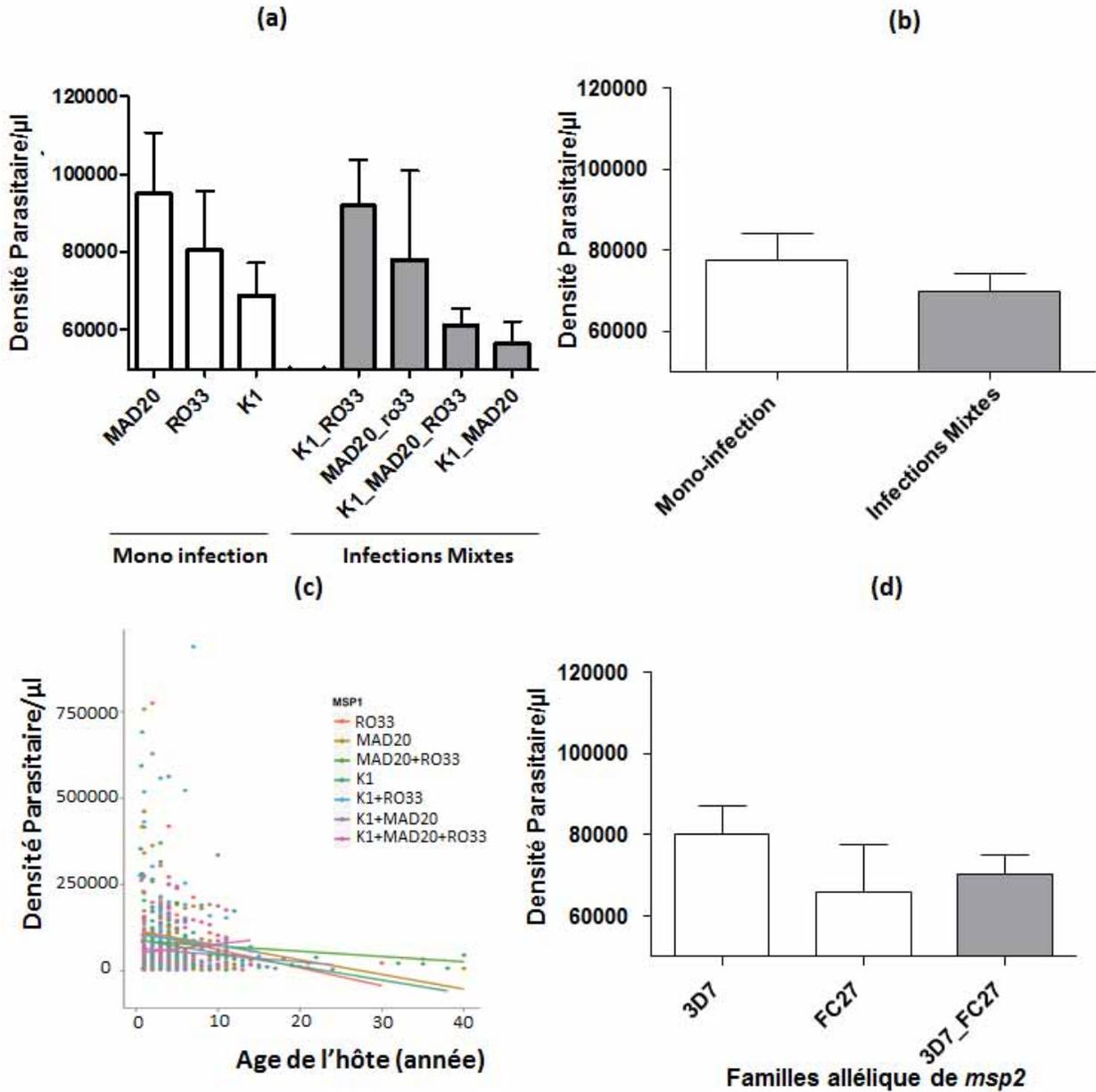


Figure 19: Effet de la variabilité allélique de *msp1* et de *msp2* sur la densité parasitaire

Cette figure indique que la variabilité allélique de *msp1* influence le niveau de parasitémie. La famille allélique MAD20 était beaucoup plus associée aux fortes densités parasitaires, suivie des familles RO33 et K1 respectivement (LRT $X^2_6 = 21,7$ p = 0,0013 Figure 18a). Pour ce gène (*msp1*), aucune différence du niveau de parasitémie n'a été observée entre les infections polyclonales et monoclonale (LRT $X^2_1 = 1,6$ p = 0,22 Figure 18b). L'âge du patient avait une grande influence sur le niveau de parasitémie. Les fortes densités

parasitaires étaient observées chez les moins âgés alors que les plus âgés présentaient les faibles niveaux de parasitémie. (LRT $X^2_1 = 35,9$ $p < 0,0001$). Cet effet variait selon le type de famille allélique du gène *msp1*. Particulièrement, une augmentation de la densité parasitaire avec l'âge était observée si le patient était infesté à la fois par les trois types de clones (K1+MAD20+RO33), alors qu'une diminution du niveau de parasitémie avec l'âge était observée dans les autres cas de figures (*msp1* x Age interaction: LRT $X^2_6 = 16,5$ $p < 0,01$ Figure 18c).

La variation des familles alléliques du gène *msp2* n'avait pas d'influence sur la densité parasitaire (LRT $X^2_2 = 2,2$ $p = 0,33$ Figure 18d). Cependant, une forte interaction avec le sexe du patient était observée, si bien qu'une différence significative du niveau de parasitémie était constatée entre les sujets de sexe masculin et ceux de sexe féminin infestés par la famille *msp2*-FC27 (LRT $X^2_2 = 7,17$ $p = 0,028$).

2. La température corporelle

La relation entre le polymorphisme de *msp1* et de *msp2* et la température corporelle est représentée dans la figure 20.

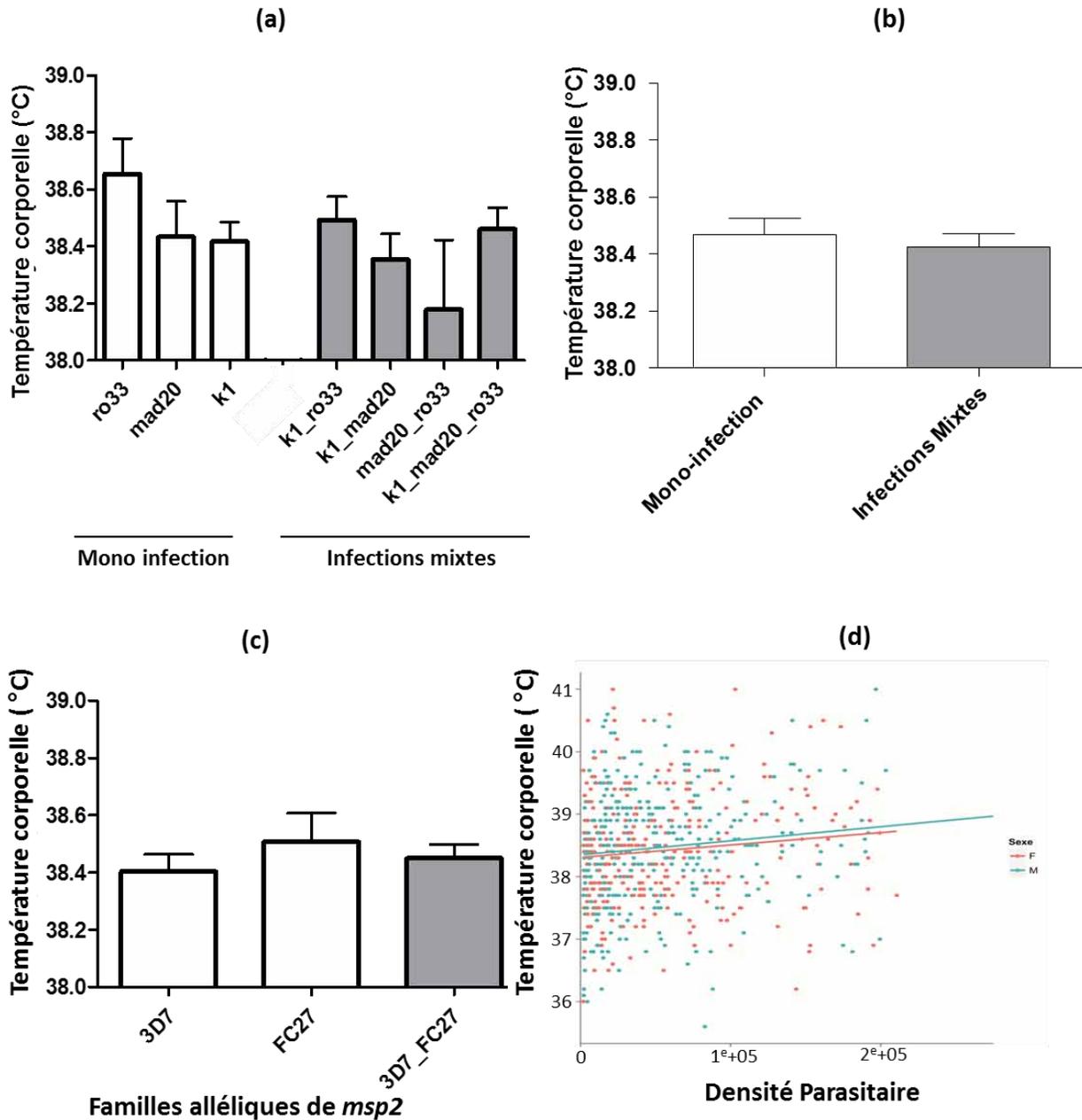


Figure 20: Effet de la variabilité allélique de *msp1* et de *msp2* sur la température corporelle

Cette figure indique que le polymorphisme du gène *msp1* ou du gène *msp2* n'avait pas d'influence sur la température corporelle ($F_{6,672} = 1,08$ $P = 0,37$ et $F_{2,666} = 0,52$ $p = 0,59$ respectivement, Figure 19a,c). D'autre part, le fait d'être infesté par plusieurs clones ne s'accompagnait pas d'une élévation de la température corporelle ($F_{6,672} = 0,363$ $p = 0,55$ Figure 19b). En outre, ni l'âge du patient, ni le sexe influençaient la température corporelle ($F_{1,672} =$

2,93 $p=0,09$ $F_{1,664} = 0,64$ $p = 0,43$, respectivement). Au contraire, la température corporelle était significativement influencée par le niveau de parasitémie; c'est-à-dire que plus la densité parasitaire est élevée, plus la température corporelle est élevée ($F_{1,672} = 9,86$ $p = 0,0017$ Figure 19d).

3. Le taux d'hémoglobine

La relation entre la variation des familles alléliques de *msp1* et *msp2* et le taux d'hémoglobine est représentée par la figure 21.

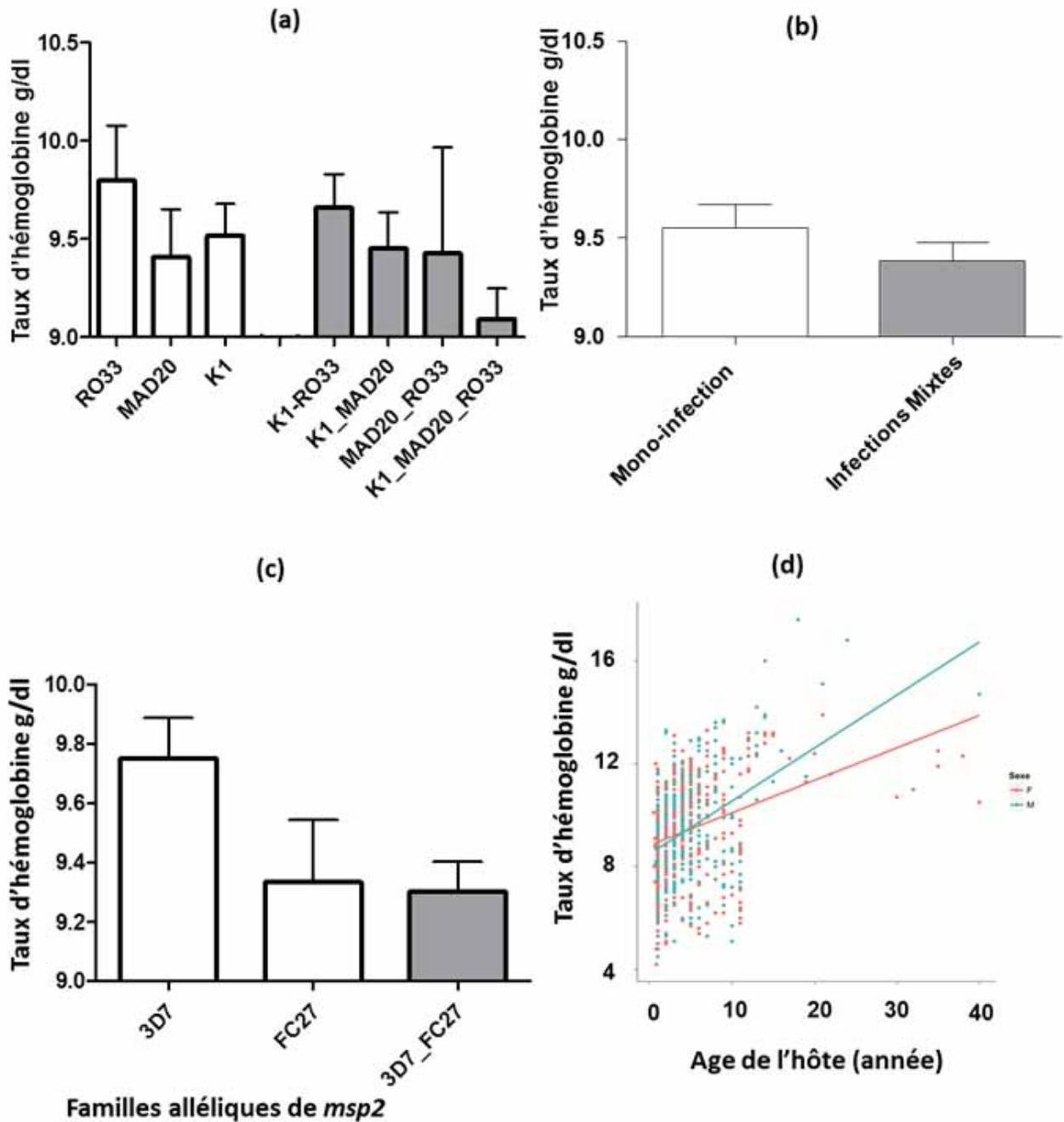


Figure 21: Effet de la variabilité allélique de *msp1* et de *msp2* sur le taux d'hémoglobine

Cette figure indique que la diversité allélique de *msp1* n'influait pas le taux d'hémoglobine ($F_{6,710} = 0,97$ $p = 0,43$ Figure 20a) et le fait d'être infesté par un ou plusieurs clones de ce type n'avait pas d'impact sur le taux d'hémoglobine ($F_{1,720} = 1,16$ $p = 0,28$ Figure 20b). Par contre, le polymorphisme allélique de *msp2* avait une influence sur le taux

d'hémoglobine. En effet, les patients infestés par la famille allélique *msp2*-FC27 présentaient de faibles valeurs de taux d'hémoglobine que les patients infestés par les clones de type 3D7 ($F_{2,710} = 4,83$ $p = 0,008$ Figure 20c). Une association positive entre l'âge du patient et le taux d'hémoglobine était notée ($F_{1,710} = 116$ $p < 0,0001$ Figure 20d). Plus le sujet est âgé, plus la valeur du taux d'hémoglobine est élevée. Enfin, on notait une influence significative du sexe sur le taux d'hémoglobine avec une susceptibilité des sujets de sexe féminin d'avoir des valeurs de taux d'hémoglobine plus basses que les sujets de sexe masculin ($F_{1,710} = 7,2$ $p = 0,07$ Figure 20d).

IV. Discussion

Dans cette étude, une moyenne de deux génotypes parasitaires différents par patients a été observée et cela peut servir d'indicateur du niveau d'endémicité mais également une non-adhérence des mesures de prévention telle que l'utilisation des MILDA. Ce nombre est comparable aux résultats d'autres études antérieures conduites dans la sous-région ouest-africaine (Mbugi *et al.*, 2006, Agyeman-Budu *et al.*, 2013).

Un aspect important de cette étude était la grande diversité des souches parasitaires circulant dans notre zone d'étude. Tous les profils polymorphiques des *msp1* et *msp2* y étaient représentés et aucune différence n'a été observée entre les deux sites de collecte (Nazoanga et Nanoro). Cela pourrait s'expliquer par la proximité des deux sites (environ 15 Km) avec un important flux migratoire de la population d'un point à l'autre. Nanoro est en effet l'un des sites ayant expérimenté le vaccin RTS,S/AS01 et cette grande diversité des souches qui circulent dans la zone soulève la question de savoir si elles répondaient toutes au même niveau à ce vaccin. Dans les infections bactériennes, la diversité des sous-types a constitué une cause majeure d'échec vaccinal pendant une longue période, d'où la nécessité de caractériser les souches parasitaires et de tester leur sensibilité lors de la mise en œuvre des essais vaccinaux contre le paludisme (Holst *et al.*, 2013).

En outre, la sévérité des manifestations cliniques du paludisme résulte d'une interaction complexe entre le parasite et l'hôte humain (Marsh and Snow, 1997, Yazdani *et al.*, 2006). Les protéines de surface du mérozoïte sont impliquées dans la symptomatologie du paludisme en participant à l'invasion du globule rouge par le mérozoïte et le mécanisme d'échappement

au système immunitaire (Boyle *et al.*, 2014, Blackman *et al.*, 1990, Holder *et al.*, 1999, Cowman and Crabb, 2006). Notre étude montre une association de certains clones du parasite avec la sévérité de certains signes de la maladie. En effet, la mono-infestation par les parasites appartenant à la famille allélique MAD20 de *msp1* serait beaucoup plus associée à l'hyper-parasitémie pendant que ceux appartenant à la famille allélique FC27 de *msp2* étaient beaucoup plus associés aux faibles valeurs du taux d'hémoglobine. L'augmentation du niveau de parasitémie et la baisse de taux d'hémoglobine sont tous deux des critères de sévérité, raison pour laquelle l'hyper-parasitémie et l'anémie sévère ont été retenues comme critères de gravité du paludisme. Cela pourrait signifier que les patients hébergeant des parasites appartenant à ces deux familles alléliques seraient beaucoup plus susceptibles au paludisme grave, même si dans l'analyse univariée cela n'était pas directement observable. Une tendance similaire a été observée dans une étude conduite en Papouasie Nouvelle Guinée qui montrait également une association entre le portage de parasite de type *msp2*-FC27 avec la sévérité de la maladie (Al-Yaman *et al.*, 1997).

Cependant, en dépit de nombreuses études conduites dans différentes localités, les connaissances sur l'association entre la diversité génétique du parasite et la symptomatologie du paludisme restent limitées à cause de la divergence des conclusions. Amodu *et al.*, ont montré que les familles alléliques K1 et MAD20 augmentaient le risque de développer un paludisme symptomatique (Amodu *et al.*, 2005). Au Gabon, il a été rapporté également une association significative entre la famille allélique MAD20 et la sévérité du paludisme (Bouyou-Akotet *et al.*, 2015). Une étude conduite en Guyane Française par Arieu *et al.*, a montré une sur-représentation d'allèle de *msp1* (*B-K1*) et certains gènes *var* spécifiques (*var-D*) beaucoup plus dans les cas de paludisme grave qu'au niveau du paludisme simple (Arieu *et al.*, 2001). Kun *et al.*, ont trouvé une association entre le portage de parasite de type K1 et l'anémie sévère (Kun *et al.*, 1998). Au Pakistan, Ghanchi *et al.*, ont trouvé que c'est la famille allélique MAD20 qui est associée au paludisme grave (Ghanchi *et al.*, 2015). A partir de toutes ces observations, il semble être évident que certains sous-types du parasite soient associés à certains signes ou à l'augmentation de leur sévérité mais leur expression semble différer d'une région à une autre.

Dans notre étude, une augmentation de la densité parasitaire avec l'âge a été observée si le patient hébergeait plus de trois types de clones distincts sur le plan allélique de *msp1* alors qu'une diminution avec l'âge a été observée dans les autres cas de figure. La diminution du niveau de parasitémie avec l'âge serait due à l'effet de la prémunition qu'acquière les sujets âgés vivant dans les zones de forte transmission comme Nanoro. L'effet opposé observé dans le cas des triples infections pourrait traduire une défaillance de cette protection immunitaire. Il a été déjà rapporté que la prémunition est spécifique de souches et donc la présence de plusieurs clones distincts à la fois entraîne une surcharge de la réponse immune qui devient inefficace (Jeffery, 1966, Johnson *et al.*, 2012, Laishram *et al.*, 2012).

Dans cette étude, la température corporelle n'était pas influencée par la variation des familles allélique ni de *msp1* ni de *msp2*. Au contraire, ce paramètre était plutôt influencé par la densité parasitaire. Cela pourrait s'expliquer par la présence du pigment malarique (qui est intense en cas de forte parasitémie) et la lyse cellulaire (globule rouge) provoquée par la multiplication des parasites qui s'accompagne d'une production de cytokine tel que le «tumor necrosis factor» (TNF), entraînant la fièvre au cours des infections palustres (Kwiatkowski, 1990, Karunaweera *et al.*, 1992). Toutefois, nos observations vis-à-vis de la fièvre et de l'anémie sont à relativiser car notre étude ne nous permettait pas de distinguer la part des autres pathologies pouvant provoquer ces signes, ce qui constitue une des limites de cette étude. Aussi, la discrimination entre espèces plasmodiales était basée uniquement sur la microscopie qui pourtant ne permet pas d'écarter avec certitude les autres espèces du même genre comme *P. malariae* et *P. ovale*.

Conclusion

Cette étude indique qu'il y a une grande diversité de sous-types de *P. falciparum* génétiquement différents qui circulent dans la zone de Nanoro. Certains clones sont beaucoup plus associés à la sévérité de certains signes particuliers de la maladie. La caractérisation des souches constitue donc un paramètre épidémiologique très important dans un tel contexte et plus particulièrement dans le cadre de la mise en œuvre d'essais vaccinaux qui connaissent aujourd'hui un essor considérable.

Aussi, les facteurs ayant une influence directe sur la population parasitaire méritent d'être explorés. La pression médicamenteuse est entre autre l'un des principaux facteurs influençant le profil des souches qui circulent dans une zone donnée, avec parfois une sélection de clones résistants. Ainsi, après l'adoption et le déploiement à large échelle des CTA, il convient de surveiller minutieusement leur impact en termes de sélection, surtout de souches mutantes. Le chapitre suivant abordera cette question de pression sélective exercée par les deux médicaments (*ASAQ et al*) sur la population parasitaire.

Chapitre 5: Etude de la relation entre les traitements Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) et Artéméther-Luméfantrine (AL) et les mutations des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* à Nanoro, Burkina Faso

I. Introduction

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques constitue un grand obstacle à la lutte contre le paludisme dans la plupart des pays endémiques. Face à la résistance à la Chloroquine (CQ), les CTA ont été recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme simple (WHO, 2015a). Actuellement, les CTA sont utilisées dans plus de 80% des pays qui ont changé leur politique de traitement à cause de la chimiorésistance du parasite (Bosman and Mendis, 2007).

Depuis l'adoption d'ASAQ *et al* au Burkina Faso, les études d'efficacité de ces deux combinaisons montrent jusqu'à nos jours des résultats satisfaisants (Tinto *et al.*, 2014b, Zongo *et al.*, 2007a, Zongo *et al.*, 2007b). Cependant, des cas de résistance à l'Artémisinine et ses dérivés ont été déjà rapportés dans cinq pays de l'Asie du Sud-Est: Cambodge, République Démocratique du Laos, Myanmar, Thaïlande et Vietnam (Noedl *et al.*, 2009, Phyo *et al.*, 2012, Ashley *et al.*, 2014). De plus, une diminution de la sensibilité des CTA a été observée dans plusieurs pays y compris en Afrique Sub-Saharienne (Borrmann *et al.*, 2011, Tinto *et al.*, 2014a). Du fait de l'absence d'un traitement aussi efficace et efficient que les CTA à l'heure actuelle pour le traitement du paludisme simple, d'énormes efforts doivent être fournis pour éviter l'émergence et la propagation de cette résistance, surtout vers l'Afrique Sub-Saharienne. Cela requiert un marqueur moléculaire valide permettant de surveiller l'évolution de cette résistance.

Bien que le marqueur Kelch 13 soit associé à la résistance *in vivo* et *in vitro* aux dérivés d'Artémisinine (Ariey *et al.*, 2014), son séquençage pour la surveillance de routine semble être laborieux pour la plupart des pays endémiques de l'Afrique Sub-Saharienne. Il a été clairement démontré que des mutations au niveau des gènes *Pfmdr1* et *Pfprt* étaient associées à la résistance aux amino-quinoléines (Djimé *et al.*, 2001, Ursing *et al.*, 2006). Etant donné

que les CTA résultent d'une combinaison entre un dérivé d'Artémisinine et une molécule associée (Luméfantrine pour AL et Amodiaquine pour ASAQ), l'efficacité du traitement dépend aussi de la sensibilité du parasite à ces molécules partenaires. De ce fait, une résistance pourrait survenir suite à une sensibilité réduite du parasite à ces dernières. Par exemple, l'Amodiaquine étant une amino-quinoléine, l'hypothèse d'une implication des mutations associées à la résistance aux amino-quinoléines dans le mécanisme de résistance de *P. falciparum* aux CTA peut être envisageable.

En outre, la résistance peut aussi être la conséquence d'une pression sélective médicamenteuse, ayant entraîné la disparition des souches sensibles (éliminées par le traitement) et une émergence des souches naturellement résistantes. Ainsi, la pression sélective des CTA doit être surveillée minutieusement après leur déploiement à large échelle jusqu'au niveau communautaire. Cependant, très peu de données sur l'impact des CTA sur la sélection de souches parasitaires sont disponibles après leur adoption au Burkina Faso. C'est au regard de tous ces aspects que la présente étude a été conduite, avec pour objectif de déterminer l'impact des traitements avec AL et ASAQ sur la sélection d'allèles des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* et de vérifier si la présence de ces allèles pouvait être associée aux échecs aux traitements.

II. Matériel et Méthodes

1. Origines des échantillons

Les échantillons de sang utilisés pour cette étude provenaient des patients inclus dans le cadre de l'étude d'efficacité et de tolérance d'ASAQ *versus* AL en conditions réelles d'utilisation et dont les résultats ont été présentés dans le chapitre 3. Seuls les échantillons du jour 0 (prétraitement) et du jour de parasitémie récurrente (post-traitement) ont été utilisés dans la présente analyse.

2. Analyses moléculaires

L'extraction de l'ADN parasitaire a été faite en utilisant le Kit Qiagen, tel que décrit en annexe 1. Les mutations ont été recherchées au niveau des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1* avant et après le traitement.

1.1. Amplification d'ADN pour la détection de mutation au niveau des gènes *Pfprt* K76T et *Pfmdr1*

La méthode de la PCR nichée a été utilisée selon la technique décrite par Dorsey *et al.* (Dorsey *et al.*, 2001). Les programmes d'amplification de chaque PCR ainsi que les séquences des amorces utilisées sont consignés dans le tableau XI ci-dessous.

Tableau XI: Programmes d'amplification et séquences des amorces pour la détection de mutations au niveau des gènes *Pfprt* et *Pfmdr1*

Gènes, Etapes de la PCR	Amorces (5'..... 3')	Programme d'amplification
<i>Pfprt</i> K76T PCR 1	<i>CRT-1</i> : GACGAGCGTTATAGAGAATTA <i>CRT-2</i> : CCAGTAGTTCTTGTAAGACC	94°C x 3min 40 x (94°C x30s, 47°C x1min, 72°C x1, 5min), 72°C x 3 min, Garder à 4°C
<i>Pfprt</i> K76T PCR2	<i>CQR-A</i> : TGTGCTCATGTGTTTAAACTT <i>CQR-B</i> : CAAAACCTATAGTTACCAAT	94°C x 5 min 30 x (94°C x30s, 52°C x1 min, 72°C x1 min), 72°C x 3 min, Garder à 4°C
<i>Pfmdr1</i> (86,184) PCR1	<i>MDR-A3</i> : TACTTTCTTATTACATATGACACCACAAACA	94 °C : 2 min, 30 X (94°C:1 min, 45°C : 1 min, 72°C : 45 s), 72°C : 5 m, Garder à 4 °C
<i>Pfmdr1</i> (86,184) PCR2	<i>MDR-A2</i> : GTCAAACGTGCATTTTTTATTAATGACCAATT <i>MDR-A4</i> : AAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAGAG	94 °C : 2 min, 30 X (94°C:1 min, 52°C: 1 min, 72°C : 45 s), 72°C : 5 min, Conserver à 4 °C
<i>Pfmdr1</i> (1034,1045, 1246) PCR1	<i>MDR-O1</i> : AGAAGATTATTTCTGTAATTTGATACAAAAAGC <i>MDR-O2</i> : ATGATTCGATAAATTCATCTATAGCAGCAA	
<i>Pfmdr1</i> (1034,1045) PCR2	<i>1034F</i> : AGAATTATTGTAATGCAGCTTTATGGGGAcT <i>1042R</i> : AATGGATAATATTTCTCAAATGATAAcTTaGCA	
<i>Pfmdr1</i> (1246) PCR2	<i>1246F</i> : ATGATCACATTATATTAATAAATGATATGACAAA <i>MDR-O2</i> : ATGATTCGATAAATTCATCTATAGCAGCAA	

Cinq microlitres d'extrait d'ADN servant de matrice ont été utilisés pour lancer la première PCR. Un microlitre du produit d'amplification du premier round est utilisé comme ADN matrice pour lancer les 2nd rounds de PCR nichée. Toutes les PCR se sont réalisées à un volume total de 25 µl comme l'indique le tableau XII.

Tableau XII: Mélange réactionnel des PCR pour la détection de mutations au niveau des gènes *Pfcr1* et *Pfmdr1*

Réactifs	PCR 1		PCR 2	
	Concentrations	Volumes (µL) à prélever	Concentrations	Volumes (µL) à prélever
H ₂ O ultra pure		16,05		16,05
Amorce sens	10 µM	0,5	10 µM	0,5
Amorce Antisens	10 µM	0,5	10 µM	0,5
Buffer	10X	2,5	10X	2,5
dNTPs	5 mM	2,5	5 mM	2,5
MgCl ₂	25 mM	0,75	25 mM	0,75
Taq polymérase	5 U/µL	0,2	5 U/µL	0,2
Extrait d'ADN	Inconnue	2	inconnue	2
Volume final =			25 µL	

Après l'amplification, 5 µL du produit de la seconde amplification sont migrés par électrophorèse est faite pour confirmer le succès et la validité de la PCR.

1.2. Digestion des fragments d'ADN par les enzymes de restriction

Pour *Pfcr1*, les produits PCR ont été digérés par l'enzyme de restriction *Apo I* (NEB). Il s'agit d'une endonucléase recombinante purifiée à partir de la bactérie *E. coli* portant un plasmide cloné par le gène *Apo I* de *Arthrobacter protophormiae* (C. Polosson). Elle est spécifique de la présence d'une Lysine dans le codon 76 du gène *Pfcr1*. Son site de restriction est le suivant:

5'...R^VAATTY...3'

3'...YTTAA_^R...5'

R= A ou G, Y= C ou T

La coupure par cette enzyme de restriction donne deux fragments de 34 paires de bases (Pb) et 100 Pb pour les types sauvages. L'absence de coupure caractérise la présence de la mutation recherchée avec un fragment unique à 134 Pb. Les conditions de digestion et les constituants du mélange réactionnel sont consignés dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation
Pfcrf K76T

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μL)	Condition de digestion
H2O	-	-	6,8	50°C pendant 2 heures
Neb 3	10X	1X	2,0	
BSA	100X	1X	0,2	
<i>Apo I</i> (NEB)	10 U/μL	1U	1,0	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

Pour l'étude du codon 86 du gène *Pfmdr1*, les produits PCR ont été digérés avec les enzymes de restriction *Afl III* (NEB), une endonucléase de restriction purifiée à partir de la bactérie *E. coli* portant un plasmide cloné par le gène *Afl III* de *Anabaena flos-aquae* (CCAP 1403/13f). Le site de restriction de l'enzyme est:

5'...A^VCRYGT...3'

3'...TGYRC_^A...5'

R= A ou G, Y= C ou T

Après digestion par cette enzyme, l'absence de coupure exprime la présence de souches parasites de type sauvage avec un fragment unique à 560 Pb, pendant que ce fragment est clivé en deux (232 Pb et 328 Pb) en présence de souches parasites de type mutant. Les conditions de digestion et les constituants du mélange réactionnel sont consignés dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation *Pfmdr1*- N86Y

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)	Condition de digestion
H ₂ O	-	-	7,4	37°C pendant
NEB 4	10X	1X	2,0	2 heures
BSA	100X	1X	0,2	
<i>Afl III</i> (NEB)	5 U/µL	2U	0,4	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

Pour le codon 184 du même gène, l'enzyme de restriction *Dra I* (NEB) a été utilisée. Il s'agit d'une endonucléase de restriction purifiée à partir de la bactérie *E. coli* portant un plasmide cloné par le gène *Dra I* de *Deinococcus radiophilus* (ATCC 27603) qui reconnaît et coupe la séquence d'ADN spécifiquement à l'endroit ci-dessous:

5'...TTT^vAAA...3'

3'...AAA[^]TTT ...5'

La coupure donne deux fragments de 204 Pb et 242 Pb pour les types sauvages et trois fragments 114 Pb, 173 Pb et 242 Pb pour les types mutants. Les conditions de digestion et les constituants du mélange réactionnel sont consignés dans le tableau XV.

Tableau XV: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation
Pfmdr1- Y184F

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)	Condition de digestion
H ₂ O	-	-	7,25	37°C pendant
NEB 4	10X	1X	2,0	2 heures
<i>Dra I</i> (NEB)	20 U/µL	15U	0,75	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

L'enzyme de restriction *Dde I* (NEB) a été utilisée pour la digestion des produits PCR pour la détection de la mutation *Pfmdr1*-S1034C. L'enzyme a été purifiée à partir d'*E. coli* portant le plasmide cloné *Dde I* de *Desulfovibrio desulfuricans* (NCIB83120). Son site de restriction est le suivant:

5'...C^VTNAG...3'

3'...GANT_^C ...5'

Deux fragments de 60 Pb et 172 Pb ont été obtenus en présence des types sauvages. Pour les types mutants, deux fragments de 27Pb et 205 Pb ont été obtenus à l'issue de la coupure par cette enzyme de restriction. Sur le tableau XVI figurent les conditions de digestion, les concentrations et volumes des différents constituants réactionnels pour cette digestion.

Tableau XVI: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation
Pfmdr1- S1034C

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL)	Condition de digestion
H ₂ O	-	-	7,8	37°C pendant
NEB 3	10X	1X	2,0	1,5 heures
<i>Dde I</i> (NEB)	10 U/µL	2U	0,2	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

Pour le codon 1042, l'enzyme de restriction *Ase I* (NEB), une endonucléase provenant de la bactérie *E. coli* portant le plasmide cloné par le gène *Ase I* de *Aquaspirillum serpens* (ATCC 12638) a été utilisée. Son site de restriction est:

5' ...AT^vTAAT...3'

3' ...TAAT_^TA ...5'

En présence de souches parasitaires de type sauvage, deux fragments de 116 Pb chacun (une bande sur gel d'agarose) étaient observés. Quand il s'agissait de souches mutantes, deux fragments de 56 Pb et 176 Pb étaient observés. Le tableau XVII montre les volumes et les concentrations des constituants du mélange réactionnel pour cette digestion.

Tableau XVII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation
Pfmdr1- N1042D

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μL)	Condition de digestion
H ₂ O	-	-	7,8	37°C pendant 1,5 heures
NEB 3	10X	1X	2,0	
<i>Ase I</i> (NEB)	10 U/μL	2U	0,2	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

En ce qui concerne le codon 1246, l'enzyme de restriction *Eco RV* (NEB) a été utilisée pour la digestion des produits PCR. Il s'agit d'une enzyme purifiée à partir d'*Ecoli* portant le plasmide cloné *Eco RV* de J62pLG74 (*L.l. Glatman*). Son site de restriction est le suivant:

5' ...GAT^VATC...3'

3' ...CTA_^TAG...5'

Cette digestion donne lieu à deux fragments de 153 Pb et 191 Pb pour les types mutants. L'absence de coupure, caractérisée par un fragment unique à 344Pb signifie la présence des types sauvages. Le tableau XVIII résume les conditions de digestion, les concentrations et volumes des différents constituants réactionnels:

Tableau XVIII: Mélange réactionnel et conditions de digestion pour la détection de la mutation *Pfmdr1*- D1246Y

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (μL)	Condition de digestion
H ₂ O	-	-	7,7	37°C pendant 2 heures
NEB 3	10X	1X	2,0	
BSA	100X	1X	0,2	
<i>Eco RV</i> (NEB)	20 U/μL	2U	0,1	
Fragments d'ADN	-	-	10,0	
Volume final			20,0	

Au total 5 μL des produits de la digestion ont été utilisés pour la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Le gel a été préparé à 2,5% et la migration s'est faite à 100 volts pendant 2 heures dans une solution de TBE 0,5X.

3. Analyse statistique

Les données cliniques utilisées étaient celles de l'évaluation de l'efficacité et de la tolérance d'ASAQ *versus* AL en conditions réelles d'utilisation au Burkina Faso. Les génotypes de *Pfcr1* et *Pfmdr1* ont été déterminés sur la base de la présence ou l'absence de l'allèle sauvage / mutant au niveau des *loci*. Les échantillons qui portaient à la fois l'allèle sauvage et l'allèle mutant et pour lesquels les fréquences relatives ne pouvaient pas être déterminées ont été exclus de l'analyse. Le test de Chi-carré a été utilisé pour évaluer les différences entre les proportions et une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme étant statistiquement significative. Une régression logistique multiple a été utilisée pour déterminer si une mutation du gène *Pfcr1* ou *Pfmdr1* était associée aux échecs observés lors du traitement avec AL ou ASAQ.

III. Résultats

1. La réponse clinique et parasitologique

Les réponses cliniques et parasitologiques des deux traitements AL et ASAQ ont été rapportées dans le chapitre 3. En rappel, 680 patients dont 340 par bras, souffrant de paludisme simple étaient enrôlés. Le taux d'échec parasitologique non corrigé par PCR était de 52,2% et 43,0% pour AL et ASAQ respectivement à l'issue des 28 jours de suivi. La correction par PCR a permis de distinguer 126 recrudescences (n=74 dans le bras AL et n= 52 dans le bras ASAQ) et 156 nouvelles infections (n= 100 dans le bras AL et n= 56 dans le bras ASAQ). Tous ces échantillons (extraits d'ADN parasite issus de ces patients) du jour 0 et du jour de parasitémie récurrente ont été considérés de façon systématique pour la détection des mutations au niveau des gènes *Pfcr* et *Pfmdr1*.

2. Evolution de la prévalence de la mutation *Pfcr* K76T cinq ans après le retrait de la chloroquine

Cinq ans après le retrait de la CQ au Burkina Faso, nous avons déterminé la dynamique de la mutation K76T du gène *Pfcr* dont l'association à la résistance à ce médicament a été rapportée. Au total, 665 échantillons du jour 0 (indépendamment de l'issue du traitement avec ASAQ ou AL) ont été analysés avec succès. Quatre-vingt-un échantillons qui portaient à la fois l'allèle sauvage et l'allèle mutant et pour lesquels il était difficile de déterminer les fréquences relatives de chaque allèle ont été exclus de l'analyse. L'allèle sauvage K76 a été trouvé dans 464 échantillons (79,45%) et l'allèle mutant dans 120 échantillons (20,55%). Entre 2010 et 2012, une diminution progressive significative ($p=0,0189$) de l'allèle mutant a été observée. Sa prévalence est passée de 27,22% à 16,49%. A l'opposé, un retour progressif de la forme sauvage sensible a été constaté. La prévalence de cet allèle est passée de 72,78% en 2010 à 83,51% en 2012. La figure 22 représente la fluctuation des prévalences des souches sauvages et mutantes entre 2010 et 2012.

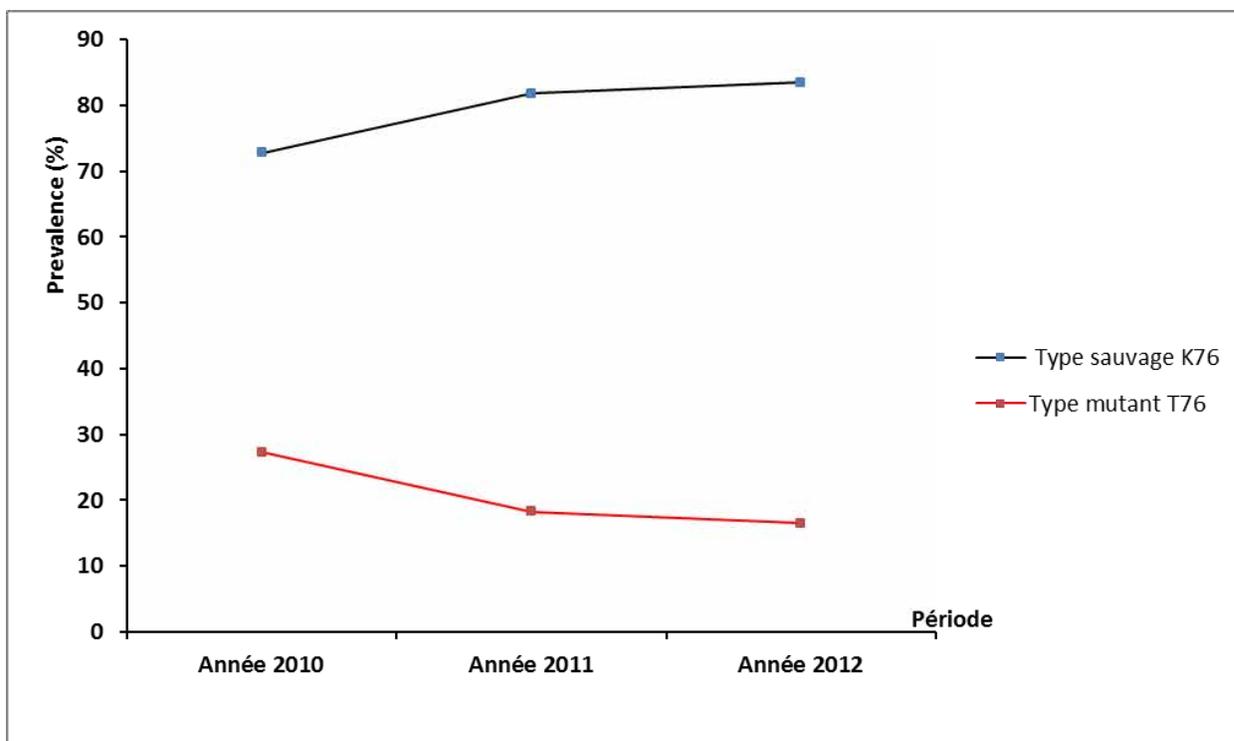


Figure 22: Fluctuation temporaire des allèles du *Pfprt* (codon 76)

3. Prévalence à l'inclusion des allèles *Pfprt* et *Pfmdr1* par groupe de traitement

Avant le traitement (Jour 0), les mutations *Pfprt* K76T et *Pfmdr1* (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y) ont été recherchées dans tous les échantillons pour lesquels les réponses au traitement étaient disponibles. La figure 23 présente le diagramme d'inclusion par groupe de traitement avec les nombres d'échantillons analysés avec succès.

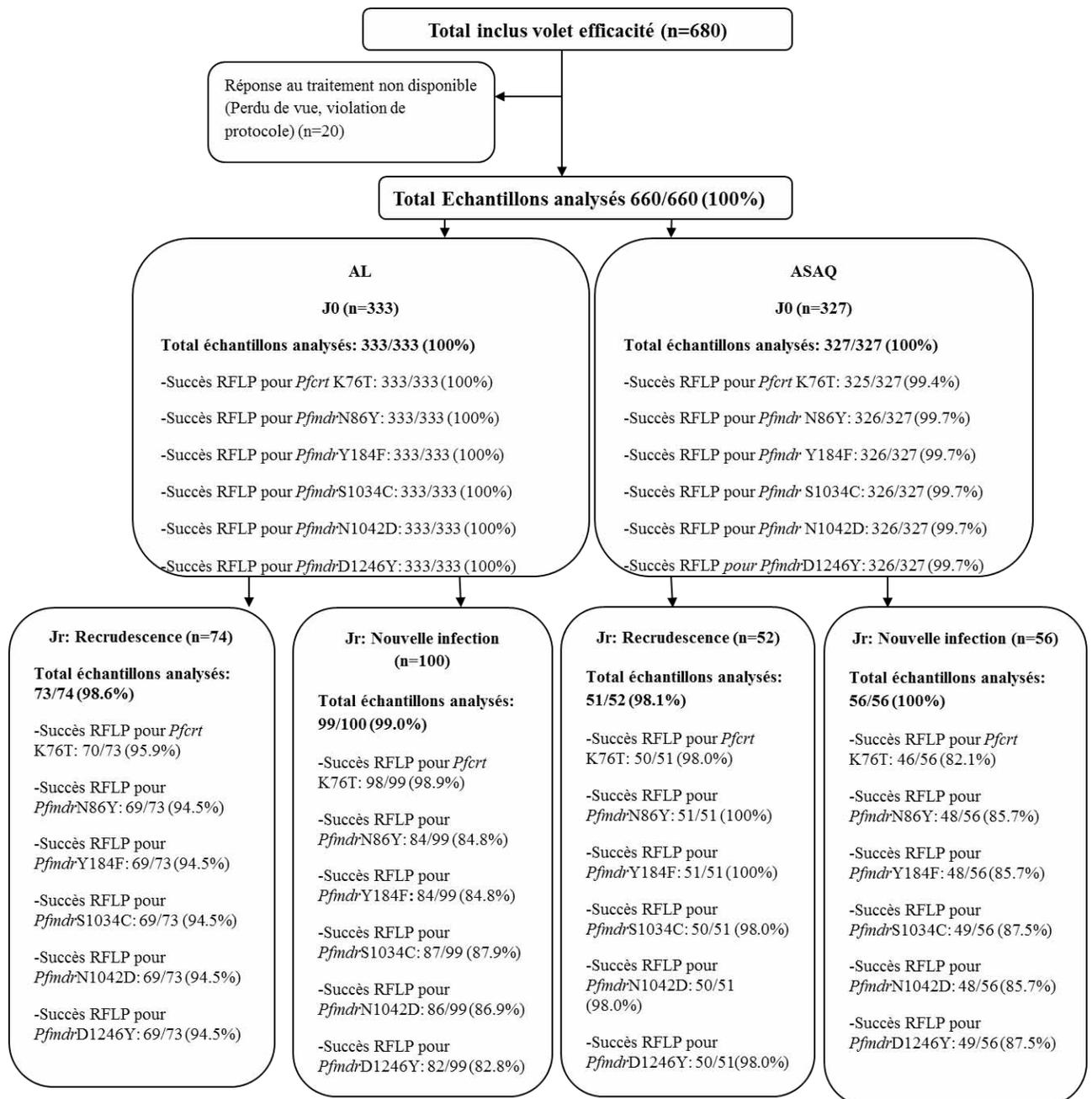


Figure 23: Diagramme d'inclusion montrant le nombre d'échantillons analysés avec succès

Avant le traitement, la prévalence de la mutation *Pfprt* K76T était similaire dans les deux groupes de traitements AL et ASAQ (21,80% versus 20,21% respectivement). La prévalence de la mutation *Pfmdr*1-N86Y était aussi identique dans les deux groupes de traitement (8,31% dans le bras AL contre 8,25% dans le bras ASAQ). Concernant la mutation *Pfmdr*1- Y184F, sa prévalence était plus élevée dans le bras ASAQ que dans le bras AL mais la différence

n'était pas statistiquement significative (53,26% contre 49,82%). La mutation *Pfmdr1*-D1246Y était extrêmement rare (n=3). Aucune mutation du *Pfmdr1*-S1034C et N1042D n'a été observée dans chacun des deux groupes de traitement.

4. Impact du traitement sur la sélection d'allèle *Pfcr*t et *Pfmdr1*

La pression sélective des traitements AL et ASAQ pour des allèles particuliers de *Pfcr*t et *Pfmdr1* a été évaluée en comparant les prévalences avant et après le traitement au niveau des recrudescences d'une part et dans le groupe des nouvelles infections d'autre part à l'issu des 28 jours de suivi. Le tableau XIX montre les prévalences des allèles de *Pfcr*t et *Pfmdr1* avant et après le traitement avec AL dans les deux groupes (recrudescence et nouvelle infection).

Tableau XIX: Prévalence des allèles de *Pfcr*t et *Pfmdr1* avant et après le traitement avec AL
%(n/N)

Gène	Allèle	Prétraitement	Recrudescence	p-value	NI	p-value
<i>Pfcr</i> t	K76	78,20 (226/289)	93,33 (56/60)	<0,00001	87,95 (73/83)	0,0487
	76T	21,80 (63/289)	6,67 (4/60)		12,05 (10/83)	
<i>Pfmdr1</i>	N86	91,69 (276/301)	95,65 (66/69)	0,2621	95,18 (79/83)	0,2868
	86Y	8,31 (25/301)	4,35 (3/69)		4,82 (4/83)	
<i>Pfmdr1</i>	Y184	50,18 (140/279)	55,74 (34/61)	0,4313	41,25 (33/80)	0,1588
	184F	49,82 (139/279)	44,26 (27/61)		58,75 (47/80)	

La prévalence de l'allèle sauvage *Pfcr*t-K76 augmentait significativement après le traitement avec AL à la fois au niveau des recrudescences ($p < 0,00001$) et des nouvelles infections ($p = 0,0487$) pendant qu'une diminution de la prévalence de l'allèle mutant *Pfcr*t-T76 était observée. Une augmentation de l'allèle *Pfmdr1*-N86 après le traitement avec AL était observée dans les deux groupes mais la différence n'était pas statistiquement significative. Pour le codon *Pfmdr1*-184, une légère augmentation de l'allèle sauvage était constatée au niveau des recrudescences alors que l'allèle mutant était légèrement surreprésenté au niveau des nouvelles infections. Le tableau XX présente les prévalences des allèles *Pfcr*t et *Pfmdr1* avant et après le traitement avec ASAQ.

Tableau XX: Prévalence des allèles *Pfcr*t et *Pfmdr*1 avant et après le traitement avec ASAQ %
(n/N)

Gène	Allèle	Prétraitement	Recrudescence	P-value	NI	p-value
<i>Pfcr</i> t	K76	79,79 (225/282)	57,89 (22/38)	0,0025	34,21 (13/38)	<0,00001
	76T	20,21 (57/282)	42,11 (16/38)		65,79 (25/38)	
<i>Pfmdr</i> 1	N86	91,75 (267/291)	89,36 (42/47)	0,5873	73,81 (31/42)	0,0004
	86Y	8,25 (24/291)	10,64 (5/47)		26,19 (11/42)	
<i>Pfmdr</i> 1	Y184	46,74 (136/291)	39,13 (18/46)	0,3356	40,43 (19/47)	0,4205
	184F	53,26 (155/291)	60,87 (28/46)		59,57 (28/47)	

Contrairement à AL, c'est la prévalence de l'allèle mutant *Pfcr*t-T76 qui augmentait significativement après le traitement avec ASAQ à la fois au niveau des recrudescences (p=0,0025) et des nouvelles infections (p<0,00001) alors qu'une diminution de l'allèle sauvage était observée. Après le traitement avec ASAQ, il y avait aussi une augmentation de la prévalence de l'allèle mutant *Pfmdr*1-86Y et la différence devenait statistiquement significative dans le groupe des nouvelles infections (p=0,0004).

5. Relation entre la présence d'allèles *Pfcr*t et *Pfmdr*1 et les échecs au traitement

Une analyse multi variée a été réalisée pour évaluer si le portage d'un allèle donné de *Pfcr*t et *Pfmdr*1 était associé aux échecs au traitement. L'influence de l'âge a été prise en compte après une stratification des patients en deux groupes (<5 ans et ≥ 5 ans) compte tenu de l'importance de cette distinction dans l'épidémiologie du paludisme. Le taux d'hémoglobine et la densité parasitaire ont été aussi stratifiés en deux groupes (<Hb/DP médian et ≥ Hb /DP médian). Le tableau XXI présente les résultats de l'analyse multi variée de la relation entre le portage au jour 0 d'allèles de *Pfcr*t et *Pfmdr*1 et les échecs observés au cours du traitement avec AL.

Tableau XXI: Analyse multi variée de la relation entre les allèles de *Pfcr*t et *Pfmdr*1 et les échecs au traitement avec AL

	OR Brute	95%IC	p-value	OR ajusté	95%IC	p-value
Groupe d'Age						
< 5 ans	1,43	0,74 – 2,73	0,277			
≥ 5 ans	1,00	-	-			
Taux Hémoglobine						
< médiane= 9 g/dl	1,25	0,73 – 2,16	0,404			
≥ médiane= 9 g/dl	1,00	-	-			
Densité Parasitaire						
< G médiane=30529 / μ l	1,00	-	-			
≥ G médiane=30529 / μ l	1,16	0,68 – 1,98	0,566			
<i>Pfcr</i>t K76T						
Sauvage	1,70	0,78 – 3,69	0,176	1,15	0,47 – 2,81	0,751
Mutant	1,00	-	-	1,00	-	-
<i>Pfmdr</i>1 N86Y						
Sauvage	1,00	-	-	1,00	-	-
Mutant	1,16	0,44 – 3,03	0,760	2,59	0,82 – 8,08	0,101
<i>Pfmdr</i>1-Y184F						
Sauvage	1,00	-	-	1,00	-	-
Mutant	0,46	0,25 – 0,85	0,014	0,37	0,16 – 0,83	0,017

Une association significative entre le portage au jour 0 de l'allèle *Pfmdr*1-Y184 avec les échecs au cours du traitement avec AL a été observée. Le tableau XXII présente les résultats de l'analyse multi variée de la relation entre le portage au jour 0 d'allèles *Pfcr*t et *Pfmdr*1 et les échecs observés au cours du traitement avec ASAQ.

Tableau XXII: Analyse multi varié de l'association entre les allèles des gènes *Pfcrt* et *Pfmdr1* et les échecs au traitement avec ASAQ

	OR Brute	95%IC	P-value	OR ajusté	95%IC	p-value
Groupe d'Age						
< 5 ans	2,25	0,97 – 5,24	0,058			
≥ 5 ans	1,00	-	-			
Taux d'hémoglobine						
< médiane= 9 g/dl	1,00	-	-			-
≥ médiane= 9g/dl	0,46	0,25 – 0,86	0,016			
Densité Parasitaire						
< médiane=30762 / μ l	1,00	-	-			-
≥ médian=30762 / μ l	1,46	0,78 – 2,73	0,225			
<i>Pfcrt</i> K76T						
Sauvage	1,00	-	-	1,00	-	-
Mutant	1,20	0,55 – 2,61	0,633	1,68	0,67 – 4,21	0,263
<i>Pfmdr1</i> N86Y						
Sauvage	1,00	-	-	1,00	-	-
Mutant	0,86	0,24 – 3,02	0,815	0,78	0,20 – 3,01	0,729
<i>Pfmdr1</i>-Y184F						
Sauvage	1,00	-	-	1,00	-	-
Mutant	0,95	0,49 – 1,84	0,901	0,96	0,43 – 2,14	0,932

Aucune association entre les allèles des gènes *Pfcrt* et *Pfmdr1* avec les échecs au traitement avec ASAQ n'a été observée.

IV. Discussion

La compréhension du mécanisme de résistance de *P. falciparum* aux CTA constitue actuellement une préoccupation majeure, vu que des cas de résistance à l'Artémisinine ont été observés dans certaines parties du monde. Dans cette étude, nous avons investigué sur la pression sélective des deux traitements recommandés pour le traitement du paludisme simple au Burkina Faso et étudier la relation entre la présence d'allèles des gènes *Pfcrt* et *Pfmdr1* et les échecs observés au cours du traitement.

Il ressort de cette étude que cinq ans après le retrait de la CQ au Burkina Faso, il y a un retour progressif de souches sensibles aux amino-4-quinoléines. En effet avant le changement de la politique, la prévalence de la mutation K76T du gène *Pfcr* atteignait plus de 65% dans certaines localités du pays (Tinto *et al.*, 2005). Cette diminution drastique de la prévalence avec le temps serait imputable au changement de la politique de traitement. La prévalence rapportée dans notre étude représente environ la moitié de ce qui avait été rapporté cinq ans plutôt et confirme les résultats d'une étude *ex-vivo* sur la sensibilité de la CQ conduite par Tinto *et al.*, à la même période (Tinto *et al.*, 2014a). Tout cela montre que la résistance à la CQ diminue après l'introduction des CTA. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres pays africains, en particulier au Malawi où il a été rapporté une disparition complète des souches résistantes neuf ans après le retrait de la CQ (Laufer *et al.*, 2010, Kublin *et al.*, 2003). Néanmoins, la prévalence de la mutation reste élevée au Burkina Faso, comparativement à ce qui a été rapporté au Malawi. Cela pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs y compris la période de cette étude qui a lieu seulement cinq ans après le retrait de la CQ alors que celle de Malawi est intervenue neuf ans plus tard. En plus, étant donné que l'Amodiaquine est un constituant de la combinaison ASAQ, qui est largement utilisée sur toute l'étendue du territoire national, il pourrait y avoir une pression de sélection de souches résistantes due à la similarité de structure entre la CQ et ce dernier. En effet, une corrélation positive des CI50 de l'Amodiaquine et de la CQ a été rapportée lors de l'étude *ex-vivo* conduite par Tinto *et al.*, et cela suggère l'existence d'une résistance croisée entre les deux médicaments (Tinto *et al.*, 2014a). L'apparition de la résistance aux CTA ouvre la piste pour des recherches sur de nouvelles alternatives thérapeutiques. Dans cette optique, la possibilité de la réintroduction de la CQ en association avec d'autres constituants a été proposée par certains auteurs (Chandra *et al.*, 2013, Hand and Meshnick, 2011). A cet effet, l'association Chloroquine-Azithromycine a déjà montré des résultats promoteurs chez les femmes enceintes (Chandra *et al.*, 2013). Toutefois, l'existence de souches résistante au niveau de prévalence que nous avons rapporté montre que le recours à cette stratégie est moins indiqué dans un futur proche au Burkina Faso.

Nous avons trouvé que les prévalences au jour 0 (avant le traitement) des différents allèles des gènes *Pfcr* et *Pfmdr1* étaient comparables dans les deux groupes de traitements (AL et

ASAQ). Cela signifie que toute variation de ces prévalences au cours du suivi (après la prise du traitement) entre les deux bras dépendait du type de traitement administré. De plus, à l'exception de la mutation *Pfmdr1*-Y184F dont la prévalence était élevée, les autres mutations s'étaient retrouvées à des prévalences relativement faibles. En effet, le Burkina Faso était une zone dont la résistance à la CQ était élevée (avec une forte prévalence de ces mutations) (Tinto *et al.*, 2005) et cette baisse de prévalences des mutations est attribuable au changement de la politique de traitement qui a passé de la CQ aux CTA en 2005 (Sondo *et al.*, 2015c). Cette prévalence élevée de la mutation *Pfmdr1*-Y184F au Burkina Faso a été déjà rapportée par une étude antérieure et de ce fait, l'implication de cette mutation mérite une attention particulière (Somé *et al.*, 2010).

Nos résultats montrent une sélection positive des allèles sauvages *Pfcrt*-K76 et *Pfmdr1*-N86 après le traitement avec AL et ce même constat avait été fait par plusieurs études conduites dans différentes zones (Baraka *et al.*, 2015, Dokomajilar *et al.*, 2006, Sisowath *et al.*, 2009, Sisowath *et al.*, 2005). Fort heureusement, cela n'affecte pas l'efficacité du traitement car les souches sélectionnées n'étaient pas associées aux échecs au traitement. Cependant, lors d'une étude récente (méta-analyse) conduite par Venkatesan *et al.*, l'allèle *Pfmdr1*-N86 a été identifié comme un facteur de risque indépendant à la survenue des recrudescences et par conséquent cette pression sélective mérite d'être surveillée minutieusement (Venkatesan *et al.*, 2014).

Nous avons également rapporté une sélection positive des allèles mutants *Pfcrt*-76T et *Pfmdr1*-86Y après le traitement avec ASAQ. Étant donné que ces allèles sont associés à la résistance à la CQ et AQ, nous estimons que cette sélection est due à la présence de l'Amodiaquine comme médicament associé dans cette combinaison thérapeutique (Ochong *et al.*, 2003, Tinto *et al.*, 2008). Dans un tel contexte, même si les souches sélectionnées ne sont pas associées aux échecs au traitement, cela pourrait compromettre l'efficacité de l'ASAQ dans le futur (quand les souches mutantes vont être prédominantes dans la zone) par une diminution de la sensibilité à l'AQ dans les zones qui ont connu une forte chloroquinorésistance tel que le Burkina Faso. Cela signifie qu'en pareil situation, AL serait mieux indiqué que ASAQ dans ces zones.

A partir de ce qui est mentionné plus haut, il apparaît que AL et ASAQ exercent des effets antagonistes dans la sélection des souches parasitaires, telle que rapportée par une étude antérieure (Venkatesan *et al.*, 2014). L'allèle sauvage *Pfmdr1*-Y184 semble être associé aux échecs au traitement avec AL. Mais il n'était pas sélectionné après le traitement. Toutefois, une étude antérieure a montré une association entre la mutation *Pfmdr1*-Y184F avec la diminution de la sensibilité à la Luméfantrine (Mungthin *et al.*, 2010). Par conséquent, on peut dire que cette association entre l'allèle *Pfmdr1*-Y184 et les échecs pourrait être due au fait du hasard mais cela mérite d'être vérifié dans d'autres études.

La relation entre le portage d'allèles *Pfcrt* et *Pfmdr1* allait être plus facile à établir si les prises de traitement étaient supervisées lors de l'étude d'efficacité et cela a été mentionné comme une limite de cette étude (Sondo *et al.*, 2015b). Aussi, l'utilisation de deux marqueurs de polymorphisme (*msh1* et *msh2*) au lieu de trois (*msh1*, *msh2* et *Grurp*) pour distinguer les recrudescences des nouvelles infections a constitué une autre limite de notre étude. Cela peut aussi être la raison pour laquelle il n'y avait pas de différence de prévalence des allèles *Pfcrt* et *Pfmdr1* entre le groupe des recrudescences et le groupe des nouvelles infections.

Dans cette étude, la mutation *Pfmdr1*-D1246Y était extrêmement rare si bien qu'il était difficile de corrélérer sa présence à la réponse au traitement. Aucune mutation *Pfmdr1*-S1034C et *Pfmdr1*-N1012D n'a été détectée et l'inexistence de ces deux mutations a été rapportée dans plusieurs études conduites en Afrique (Somé *et al.*, 2010, Humphreys *et al.*, 2007).

Conclusion

Après le changement de la politique de traitement au Burkina Faso, il y a un retour progressif de souches chloroquino-sensibles. Les deux CTA recommandées pour le traitement du paludisme simple (AL et ASAQ) exercent des effets antagonistes dans la sélection d'allèles des gènes *Pfcrt* et *Pfmdr1*. Cela montre l'effet bénéfique de l'utilisation concomitante de plusieurs médicaments comme traitements de première intention, toute chose qui pourrait permettre de réduire la pression de sélection de chaque médicament pour un allèle particulier. Aucune association entre les allèles de ces deux gènes et les échecs aux traitements n'a été observée.

Chapitre 6: Discussion générale et implications pour la santé publique

La prise en charge adéquate des cas de paludisme constitue de nos jours une composante clé du contrôle de la maladie. Les CTA représentent aujourd'hui les traitements par excellence du paludisme simple à *P. falciparum*. Du fait de l'absence d'alternatives thérapeutiques, la préservation de leur efficacité constitue une préoccupation majeure. Cela passe par la surveillance continue de la résistance aux antipaludiques.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre par une surveillance *in vivo* de l'efficacité des deux combinaisons adoptées par le Burkina Faso et l'évaluation de leur impact sur la population parasitaire. En se conformant aux conditions réelles d'utilisation de ces deux médicaments dans les centres de santé périphériques du Burkina Faso, l'étude fournit des données qui reflètent le niveau réel de l'efficacité de ces deux combinaisons sur le terrain. En effet, une baisse d'efficacité a été rapportée, comparativement aux résultats des essais cliniques classiques au cours desquels les traitements sont observés. Sur le plan de la santé publique, ce faible taux d'efficacité a comme implication l'augmentation des coûts alloués pour la prise en charge de la maladie et le risque de compromission de l'efficacité à long terme de ces deux antipaludiques. A ce sujet, la question fondamentale qui se pose est que faut-il faire pour palier à cette baisse d'efficacité dans les conditions réelles d'utilisation? Selon nous, cela passe d'abord par une bonne observance du traitement en évitant les traitements interrompus et inappropriés. Nous recommandons fortement qu'au moins la première prise du traitement soit observée par les infirmiers des centres de santé ou les agents de santé communautaires, chargés de la prise en charge à domicile.

Notre étude a montré que plus de la moitié des patients ayant reçu un traitement initial ont présenté un nouvel épisode palustre au cours des 28 jours de suivi. La majorité d'entre eux était des nouvelles infections par des souches parasitaires différentes sur le plan génétique. Cela pourrait être lié à une non-adhérence des mesures prophylactiques telle que l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées à Longue durée d'Action (MILDA). Les campagnes de sensibilisation autour des mesures prophylactiques méritent d'être intensifiées afin d'obtenir un impact réel. Sur le plan de la santé publique, il convient de tenir compte dans le choix d'un médicament, de son effet curatif mais également de son effet prophylactique post-traitement.

Dans un tel contexte, un médicament alternatif à AL et ASAQ avec une demi-vie plus longue pourrait permettre de réduire l'incidence de ces nouvelles infections.

Un autre aspect important de notre étude a été la surveillance des marqueurs moléculaires de la résistance. Nous avons trouvé que les mutations au niveau des gènes *Pfcr* et *Pfmdr1* n'étaient pas associées aux échecs observés au cours du traitement. Ces marqueurs moléculaires ne sont donc pas appropriés pour la surveillance proprement dite de la résistance aux CTA. Toutefois, ces marqueurs nous ont donné une indication de l'impact de chaque médicament sur la population parasitaire circulant et ont permis de conclure sur l'effet antagoniste des deux médicaments. Cela confirme l'effet bénéfique de l'adoption concomitante des deux combinaisons comme traitement de première intention, toute chose qui permet de réduire la pression de sélection de chacun des deux médicaments. Cependant dans les formations sanitaires périphériques du pays (CSPS), seul ASAQ est souvent disponible. Ce résultat montre que des efforts doivent être fournis pour que les deux médicaments soient disponibles dans les centres de santé périphériques.

Vu que ces marqueurs moléculaires (mutations des gènes *Pfcr* et *Pfmdr1*) ne sont pas les mieux indiqués pour la surveillance de la résistance aux CTA, il convient de suivre en routine le marqueur Kelch13-propeller qui a montré une association *in vivo* et *in vitro* à la résistance à l'Artémisinine et ses dérivés (Ariey *et al.*, 2014). Cependant, la plupart de nos laboratoires ne disposent pas d'équipement permettant de séquencer ce marqueur en routine. La création d'un laboratoire national de référence pour la surveillance de la résistance aux CTA et l'intégration aux réseaux internationaux de surveillance tel que le réseau WWARN (Worldwide Antimalarial Resistance Network) serait nécessaire pour la surveillance de cette résistance.

Enfin, notre étude a permis de montrer que quelques années après le changement de la politique de traitement qui est passée de la CQ aux CTA (ASAQ *et al*) il y a un retour progressif de souches CQ-sensibles bien que la prévalence des mutants reste encore assez élevée. Avec l'avènement de la résistance aux CTA apparue en Asie du Sud-Est, la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques s'impose comme une préoccupation scientifique majeure. L'hypothèse de la réintroduction de la CQ dans ce panel de médicaments de recours

au cas où cette résistance se propageait a été émise et la combinaison Chloroquine-Azithromycine a déjà montré des résultats encourageant chez les femmes enceintes (Chandra *et al.*, 2013, Hand and Meshnick, 2011). Toutefois, l'existence de souches mutantes à un taux encore élevé dans notre zone d'étude montre que le recours à des médicaments associant la CQ n'est pas indiqué dans un futur proche au Burkina Faso.

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons investigué plusieurs aspects de l'épidémiologie du paludisme qui méritent d'être pris en compte dans la lutte contre la maladie. Notre étude a permis de fournir des données sur l'efficacité des deux CTA adoptées par le Burkina Faso qui reflètent leur niveau réel d'efficacité tel qu'elles sont utilisées dans nos formations sanitaires périphériques. Il ressort que dans les conditions réelles d'utilisation, il y a une baisse significative d'efficacité des CTA, comparativement à ce qui est rapporté lors des essais cliniques. Les taux de guérison de 77,8% pour AL et 84,1% pour ASAQ rapportés sont nettement en deçà du seuil critique de 90% fixé par l'OMS. Cela soulève beaucoup d'inquiétudes nécessitant la conduite d'études similaires pour confirmer les résultats de notre étude. Toutefois, ces données pourraient être liées à un mésusage des CTA notamment en ce qui concerne l'inobservance des traitements et le non-respect des conditions de prise des médicaments antipaludiques comme l'AL. Les patients étaient couramment infestés par une diversité de souches de *P. falciparum* et certains clones étaient beaucoup plus associés à la sévérité de certains signes particuliers de la maladie.

L'étude a permis aussi de montrer que le profil des gènes *Pfmdr1* et *Pfcr1* ne déterminait pas la réponse au traitement. AL sélectionnait les types sauvages pendant qu'ASAQ sélectionnait les types mutants de ces gènes. Cette pression sélective mérite d'être surveillée minutieusement afin de préserver l'efficacité de ces médicaments pendant encore longtemps. Cinq ans après le changement de la politique de traitement, un retour progressif de souches chloroquino sensibles est observé mais la prévalence des mutants reste encore élevée. De ce fait, la réintroduction de médicaments associant la CQ comme alternative en cas de résistance aux CTA est moins indiquée dans un futur proche au Burkina Faso.

Perspectives

Bien qu'à l'heure actuelle aucun cas confirmé de résistance à l'Artémisinine n'a été rapporté en Afrique, il convient de renforcer la surveillance de l'apparition et la propagation de ce phénomène à travers des études similaires. Mieux encore, le séquençage du nouveau marqueur moléculaire Kelch 13-propeller permettra de détecter le plus rapidement possible, l'émergence et la propagation de parasites résistants dans la zone. Aussi, il s'avère nécessaire d'étudier son polymorphisme en relation avec les tests *in-vivo* et *ex-vivo*. De ce fait, la recherche sur ce marqueur constitue un des éléments clés des perspectives de la suite de notre thèse. Elle nous permettra d'évaluer d'une part l'évolution des mutants K13-propeller dans le temps et dans l'espace et d'autre part établir la relation entre la présence de mutations au niveau de ce gène et la réponse aux traitements avec les CTA.

Eu égard à la diversité des souches parasitaires de *P. falciparum* qui circulent dans la zone de Nanoro, une extension de cette caractérisation des souches pour couvrir tous les faciès épidémiologiques du territoire national figure dans nos perspectives. Aussi, avec les progrès réalisés en matière de recherche vaccinale contre le paludisme, un autre aspect important de la suite de nos travaux consistera à tester la sensibilité de chaque clone lors de la mise en œuvre des essais vaccinaux.

Références bibliographiques

ADAMS, A., SOUMERAI, S. B., LOMAS, J. & ROSS-DEGNAN, D. 1999. Evidence of self-report bias in assessing adherence to guidelines. *International Journal for Quality in Health Care*, 11, 187-192.

AGYEMAN-BUDU, A., BROWN, C., ADJEI, G., ADAMS, M., DOSOO, D., DERY, D., WILSON, M., ASANTE, K. P., GREENWOOD, B. & OWUSU-AGYEI, S. 2013. Trends in multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic residents in the middle belt of Ghana. *Malar J*, 12, 10.1186.

AL-YAMAN, F., GENTON, B., TARAIIKA, J., ANDERS, R. & ALPERS, M. 1997. Cellular immunity to merozoite surface protein 2 (FC27 and 3D7) in Papua New Guinean children. Temporal variation and relation to clinical and parasitological status. *Parasite immunology*, 19, 207-214.

AMODU, O., ADEYEMO, A., AYOOLA, O., GBADEGESIN, R., ORIMADEGUN, A., AKINSOLA, A., OLUMESE, P. & OMOTADE, O. 2005. Genetic diversity of the msp-1 locus and symptomatic malaria in south-west Nigeria. *Acta tropica*, 95, 226-232.

ANDERSON, T. J., HAUBOLD, B., WILLIAMS, J. T., ESTRADA-FRANCO, J. G., RICHARDSON, L., MOLLINEDO, R., BOCKARIE, M., MOKILI, J., MHARAKURWA, S. & FRENCH, N. 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular biology and evolution*, 17, 1467-1482.

ARIEY, F., HOMMEL, D., LE SCANF, C., DUCHEMIN, J. B., PENEAU, C., HULIN, A., SARTHOU, J. L., REYNES, J. M., FANDEUR, T. & MERCEREAU-PUIJALON, O. 2001. Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana. *Journal of Infectious Diseases*, 184, 237-241.

ARIEY, F., WITKOWSKI, B., AMARATUNGA, C., BEGHAIN, J., LANGLOIS, A.-C., KHIM, N., KIM, S., DURU, V., BOUCHIER, C. & MA, L. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505, 50-55.

ASHLEY, E. A., DHORDA, M., FAIRHURST, R. M., AMARATUNGA, C., LIM, P., SUON, S., SRENG, S., ANDERSON, J. M., MAO, S. & SAM, B. 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 371, 411-423.

BADOLO, A., TRAORE, A., JONES, C. M., SANOU, A., FLOOD, L., GUELBEOGO, W. M., RANSON, H. & SAGNON, N. F. 2012. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise. *Malar J*, 11, 232.

BAIRD, J. K., AGYEI, S. O., UTZ, G. C., KORAM, K., BARCUS, M. J., JONES, T. R., FRYAUFF, D. J., BINKA, F. N., HOFFMAN, S. L. & NKRUHMAH, F. N. 2002. Seasonal malaria attack rates in infants and young children in northern Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66, 280-286.

BAIRD, J. K. & JONES, T. R. 1992. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC® capillary tubes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 3-5.

BANNISTER, L., HOPKINS, J., FOWLER, R., KRISHNA, S. & MITCHELL, G. 2000. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology today*, 16, 427-433.

BARAKA, V., TINTO, H., VALEA, I., FITZHENRY, R., DELGADO-RATTO, C., MBONYE, M. K., VAN OVERMEIR, C., ROSANAS-URGELL, A., VAN GEERTRUYDEN, J. P., D'ALESSANDRO, U. & ERHART, A. 2015. In Vivo Selection of *Plasmodium falciparum* Pfcrt and Pfmdr1 Variants by Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 734-7.

BARCIA, J. J. 2007. The Giemsa stain: its history and applications. *International journal of surgical pathology*, 15, 292-296.

BASCO, L. & RINGWALD, P. 1999. [Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches]. *Sante (Montrouge, France)*, 10, 47-50.

BAUDON, D., DECOUVOUX ROUX, J. & SONDO, B. 1984. Etude de la sensibilité de *P. falciparum* ala chloroquine dans une savane de Haute-Volta apaludisme hyper-endémique: utilisation des tests in vivo et in vitro. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 77, 658-665.

BEI, A. K., DESIMONE, T. M., BADIANE, A. S., AHOUIDI, A. D., DIEYE, T., NDIAYE, D., SARR, O., NDIR, O., MBOUP, S. & DURAISINGH, M. T. 2010. A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. *American journal of hematology*, 85, 234-237.

BELÉN CASSERA, M., ZHANG, Y., Z HAZLETON, K. & L SCHRAMM, V. 2011. Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum*. *Current topics in medicinal chemistry*, 11, 2103-2115.

BELL, D. J., WOOTTON, D., MUKAKA, M., MONTGOMERY, J., KAYANGE, N., CHIMPENI, P., HUGHES, D. A., MOLYNEUX, M. E., WARD, S. A. & WINSTANLEY, P. A. 2009. Measurement of adherence, drug concentrations and the effectiveness of artemether-lumefantrine, chlorproguanil-dapsone or sulphadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated malaria in Malawi. *Malaria journal*, 8, 204.

BIANCO, A., BATTYE, F. & BROWN, G. 1986. *Plasmodium falciparum*: rapid quantification of parasitemia in fixed malaria cultures by flow cytometry. *Experimental parasitology*, 62, 275-282.

BLACKMAN, M. J., HEIDRICH, H.-G., DONACHIE, S., MCBRIDE, J. & HOLDER, A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *The Journal of experimental medicine*, 172, 379-382.

BLANCHY, S., RAKOTONJANABELO, A. & RANAIVOSON, G. 1993. Surveillance épidémiologique du paludisme instable. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 3, 247-255.

BOJANG, K., OBARO, S. K., D'ALESSANDRO, U., BENNETT, S., LANGEROCK, P., TARGETT, G. & GREENWOOD, B. 1998. An efficacy trial of the malaria vaccine SPf66 in Gambian infants—Second year of follow-up. *Vaccine*, 16, 62-67.

BORRE, M. B., DZIEGIEL, M., HØGH, B., PETERSEN, E., RIENECK, K., RILEY, E., MEIS, J. F., AIKAWA, M., NAKAMURA, K. & HARADA, M. 1991. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Molecular and biochemical parasitology*, 49, 119-131.

BORRMANN, S., SASI, P., MWAI, L., BASHRAHEIL, M., ABDALLAH, A., MURIITHI, S., FRÜHAUF, H., SCHAUB, B., PFEIL, J. & PESHU, J. 2011. Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PloS one*, 6, e26005.

BOSMAN, A. & MENDIS, K. N. 2007. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77, 193-197.

BOUYOU-AKOTET, M. K., M'BONDOUKWÉ, N. P. & MAWILI-MBOUMBA, D. P. 2015. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with mild to severe malaria in Libreville, Gabon. *Parasite*, 22.

BOYLE, M. J., LANGER, C., CHAN, J.-A., HODDER, A. N., COPPEL, R. L., ANDERS, R. F. & BEESON, J. G. 2014. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*, 82, 924-936.

BRASSEUR, P., VAILLANT, M. T. & OLLIARO, P. L. 2012. Anti-malarial drug safety information obtained through routine monitoring in a rural district of South-Western Senegal. *Malar J*, 11, 402.

- BRIOLANT, S., WURTZ, N., ZETTOR, A., ROGIER, C. & PRADINES, B. 2010. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with pftetQ sequence polymorphisms and pftetQ and pfmdt copy numbers. *Journal of Infectious Diseases*, 201, 153-159.
- BROCKMAN, A., PAUL, R., ANDERSON, T., HACKFORD, I., PHAIPHUN, L., LOOAREESUWAN, S., NOSTEN, F. & DAY, K. 1999. Application of genetic markers to the identification of recrudescing *Plasmodium falciparum* infections on the northwestern border of Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 14-21.
- CARNEVALE, P., ROBERT, V., MANGUIN, S., CORBEL, V., FONTENILLE, D., GARROS, C., ROGIER, C. & ROUX, J. 2009. *Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*, IRD Edition, Marseille, p15-47.
- CHANDRA, R. S., ORAZEM, J., UBBEN, D., DUPARC, S., ROBBINS, J. & VANDENBROUCKE, P. 2013. Creative solutions to extraordinary challenges in clinical trials: methodology of a phase III trial of azithromycin and chloroquine fixed-dose combination in pregnant women in Africa. *Malar J*, 12, 122.
- CHANDRAMOHAN, D., CARNEIRO, I., KAVISHWAR, A., BRUGHA, R., DESAI, V. & GREENWOOD, B. 2001. A clinical algorithm for the diagnosis of malaria: results of an evaluation in an area of low endemicity. *Tropical medicine & international health*, 6, 505-510.
- CISSÉ, B., SOKHNA, C., BOULANGER, D., MILET, J., BÂ, E. H., RICHARDSON, K., HALLETT, R., SUTHERLAND, C., SIMONDON, K. & SIMONDON, F. 2006. Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *The Lancet*, 367, 659-667.
- COETZEE, M., HUNT, R. H., WILKERSON, R., DELLA TORRE, A., COULIBALY, M. B. & BESANSKY, N. J. 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619, 246-274.
- COGSWELL, F. B. 1992. The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clinical microbiology reviews*, 5, 26-35.
- COWMAN, A. F. & CRABB, B. S. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124, 755-766.
- COX, F. E. 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*, 3, 5.
- CUZIN-OUATTARA, N., VAN DEN BROEK, A., HABLUETZEL, A., DIABATE, A., SANOGO-ILBOUDO, E., DIALLO, D., COUSENS, S. & ESPOSITO, F. 1999. Wide-scale installation of insecticide-treated curtains confers high levels of protection against

malaria transmission in a hyperendemic area of Burkina Faso. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 473-479.

DA, M. 2003. Avancées thérapeutiques contre le paludisme en 2003. *Médecine tropicale*, 63, 267.

DE ROODE, J. C., PANSINI, R., CHEESMAN, S. J., HELINSKI, M. E., HUIJBEN, S., WARGO, A. R., BELL, A. S., CHAN, B. H., WALLIKER, D. & READ, A. F. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7624-7628.

DE STRICKER, K., VUUST, J., JEPSEN, S., OEUVRAY, C. & THEISEN, M. 2000. Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 111, 123-130.

DERRA, K., ROUAMBA, E., KAZIENGA, A., OUEDRAOGO, S., TAHITA, M. C., SORGHO, H., VALEA, I. & TINTO, H. 2012. Profile: Nanoro health and demographic surveillance system. *International journal of epidemiology*, 41, 1293-1301.

DJIMDÉ, A., DOUMBO, O. K., CORTESE, J. F., KAYENTAO, K., DOUMBO, S., DIOURTÉ, Y., COULIBALY, D., DICKO, A., SU, X.-Z. & NOMURA, T. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *New England journal of medicine*, 344, 257-263.

DOKOMAJILAR, C., NSOBYA, S. L., GREENHOUSE, B., ROSENTHAL, P. J. & DORSEY, G. 2006. Selection of *Plasmodium falciparum* pfm_{dr1} alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 1893-1895.

DONDORP, A. M., NOSTEN, F., YI, P., DAS, D., PHYO, A. P., TARNING, J., LWIN, K. M., ARIEY, F., HANPITHAKPONG, W. & LEE, S. J. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 361, 455-467.

DORSEY, G., KAMYA, M. R., SINGH, A. & ROSENTHAL, P. J. 2001. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfc_{rt} and pfm_{dr-1} genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 1417-1420.

EBOUMBOU MOUKOKO, E., BOGREAU, H., BRIOLANT, S., PRADINES, B. & ROGIER, C. 2009. Marqueurs moléculaires des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. *Médecine tropicale*, 69, 606-612.

EDWARDS, I. R. & ARONSON, J. K. 2000. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*, 356, 1255-1259.

- EL SAHLY, H., PATEL, S., ATMAR, R., LANFORD, T., DUBE, T., THOMPSON, D., SIM, B., LONG, C. & KEITEL, W. 2010. Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17, 1552-1559.
- FOLEY, M. & TILLEY, L. 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology & therapeutics*, 79, 55-87.
- FRANCIS, S. E., SULLIVAN JR, D. J., GOLDBERG & E, D. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Reviews in Microbiology*, 51, 97-123.
- FREITAS-JUNIOR, L. H., BOTTIUS, E., PIRRI, L. A., DEITSCH, K. W., SCHEIDIG, C., GUINET, F., NEHRBASS, U., WELLEMS, T. E. & SCHERF, A. 2000. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*, 407, 1018-1022.
- GARCIA, C. R., MARKUS, R. P. & MADEIRA, L. 2001. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *Journal of biological rhythms*, 16, 436-443.
- GARDNER, M. J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R. W., CARLTON, J. M., PAIN, A., NELSON, K. E. & BOWMAN, S. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.
- GARNHAM, P. 1964. The subgenera of *Plasmodium* in mammals. *Annales de la Soci et e Belge de Medecine Tropicale*, 44, 267-272.
- GHANCHI, N. K., HASAN, Z., ISLAM, M. & BEG, M. A. 2015. MAD 20 alleles of merozoite surface protein-1 (msp-1) are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria in Pakistan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48, 213-218.
- GIES, S., COULIBALY, S. O., OUATTARA, F. T. & D'ALESSANDRO, U. 2009. Individual efficacy of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in primi-and secundigravidae in rural Burkina Faso: impact on parasitaemia, anaemia and birth weight. *Tropical Medicine & International Health*, 14, 174-182.
- GREENWOOD, B., MARSH, K. & SNOW, R. 1991. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitology today*, 7, 277-281.
- GUIGUEMDE, T., AOUBA, A., OUEDRAOGO, J. & LAMIZANA, L. 1994. Ten-year surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50, 699-704.

GUPTA, S., HILL, A., KWIATKOWSKI, D., GREENWOOD, A. M., GREENWOOD, B. M. & DAY, K. P. 1994. Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 3715-3719.

GUPTA, S., SNOW, R. W., DONNELLY, C. A., MARSH, K. & NEWBOLD, C. 1999. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature medicine*, 5, 340-343.

HABLUETZEL, A., CUZIN, N., DIALLO, D., NEBIE, I., BELEM, S., COUSENS, S. & ESPOSITO, F. 1999. Insecticide-treated curtains reduce the prevalence and intensity of malaria infection in Burkina Faso. *Tropical Medicine & International Health*, 4, 557-564.

HABLUETZEL, A., DIALLO, D., ESPOSITO, F., LAMIZANA, L., PAGNONL, F., LENGELER, C., TRAORE, C. & COUSENS, S. 1997. Do insecticide-treated curtains reduce all-cause child mortality in Burkina Faso? *Tropical Medicine & International Health*, 2, 855-862.

HAMID, M. M. A., MOHAMMED, S. B. & EL HASSAN, I. M. 2013. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field isolates in Central Sudan inferred by PCR genotyping of merozoite surface protein 1 and 2. *North American journal of medical sciences*, 5, 95.

HAND, C. C. & MESHNICK, S. R. 2011. Is chloroquine making a comeback? *Journal of Infectious Diseases*, 203, 11-12.

HAPPI, C., GBOTOSHO, G., FOLARIN, O., AKINBOYE, D., YUSUF, B., EBONG, O., SOWUNMI, A., KYLE, D., MILHOUS, W. & WIRTH, D. 2005. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta tropica*, 95, 183-193.

HARBACH, R. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of entomological research*, 94, 537-553.

HENRY, M., BRIOLANT, S., ZETTOR, A., PELLEAU, S., BARAGATTI, M., BARET, E., MOSNIER, J., AMALVICT, R., FUSAI, T. & ROGIER, C. 2009. *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 1926-1930.

HERZOG, C., KIBBLER, C., ELLIS, C. & MTAWALI, C. 1983. Falciparum malaria resistant to chloroquine and fansidar: implications for prophylaxis. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 287, 947.

HESS, U., TIMMERMANS, P. M. & JONES, M. 1983. Combined chloroquine/Fansidar-resistant falciparum malaria appears in East Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 32, 217-220.

HOLDER, A., GUEVARA, P. J., UTHAIPIBULL, C., SYED, S., LING, I., SCOTT-FINNIGAN, T. & BLACKMAN, M. 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia*, 41, 409-414.

HOLST, J., OSTER, P., ARNOLD, R., TATLEY, M., NÆSS, L., AABERGE, I., GALLOWAY, Y., MCNICHOLAS, A., O'HALLAHAN, J. & ROSENQVIST, E. 2013. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9, 1241-1253.

HUMPHREYS, G., MERINOPOULOS, I., AHMED, J., WHITTY, C., MUTABINGWA, T., SUTHERLAND, C. & HALLETT, R. 2007. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51, 991-997.

INSELBURG, J. 1983. Gametocyte formation by the progeny of single *Plasmodium falciparum* schizonts. *The Journal of parasitology*, 584-591.

JEFFERY, G. M. 1966. Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. *Bulletin of the World Health Organization*, 35, 873.

JOHNSON, P. L., KOCHIN, B. F., AHMED, R. & ANTIA, R. 2012. How do antigenically varying pathogens avoid cross-reactive responses to invariant antigens? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279, 2777-2785.

KADDOURI, H., NAKACHE, S., HOUZÉ, S., MENTRÉ, F. & LE BRAS, J. 2006. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 3343-3349.

KANUNFRE, K. A., LEORATTI, F. M., HOFFMANN, E. H., DURLACHER, R. R., FERREIRA, A. W., MORAES-ÁVILA, S. L. & FERREIRA, M. U. 2003. Differential recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 variants by antibodies from malaria patients in Brazil. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10, 973-976.

KARUNAWEEERA, N. D., GRAU, G. E., GAMAGE, P., CARTER, R. & MENDIS, K. N. 1992. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 3200-3203.

KASLOW, D. C. & SHILOACH, J. 1994. Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission—blocking Vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Bio/technology*, 12, 494-499.

- KOBBE, R., KLEIN, P., ADJEI, S., AMEMASOR, S., THOMPSON, W. N., HEIDEMANN, H., NIELSEN, M. V., VOHWINKEL, J., HOGAN, B. & KREUELS, B. 2008. A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malar J*, 7, 261.
- KROGSTAD, D. J., GLUZMAN, I. Y., KYLE, D. E., ODUOLA, A., MARTIN, S. K., MILHOUS, W. K. & SCHLESINGER, P. H. 1987. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*, 238, 1283-1285.
- KUBLIN, J. G., CORTESE, J. F., NJUNJU, E. M., MUKADAM, R. A. G., WIRIMA, J. J., KAZEMBE, P. N., DJIMDÉ, A. A., KOURIBA, B., TAYLOR, T. E. & PLOWE, C. V. 2003. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 1870-1875.
- KUN, J. F., SCHMIDT-OTT, R. J., LEHMAN, L. G., LELL, B., LUCKNER, D., GREVE, B., MATOUSEK, P. & KREMSNER, P. G. 1998. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. *Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 110-114.
- KWIATKOWSKI, D. 1990. Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria. *Immunology letters*, 25, 213-216.
- KYES, S., HORROCKS, P. & NEWBOLD, C. 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55, 673-707.
- LADEIA-ANDRADE, S., FERREIRA, M. U., DE CARVALHO, M. E., CURADO, I. & COURA, J. R. 2009. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80, 452-459.
- LAISHRAM, D. D., SUTTON, P. L., NANDA, N., SHARMA, V. L., SOBTI, R. C., CARLTON, J. M. & JOSHI, H. 2012. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria journal*, 11, 1.
- LAUFER, M. K., TAKALA-HARRISON, S., DZINJALAMALA, F. K., STINE, O. C., TAYLOR, T. E. & PLOWE, C. V. 2010. Return of chloroquine-susceptible falciparum malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *Journal of Infectious Diseases*, 202, 801-808.
- LORD, C., BARNARD, B., DAY, K., HARGROVE, J., MCNAMARA, J., PAUL, R., TRENHOLME, K. & WOOLHOUSE, M. 1999. Aggregation and distribution of strains in microparasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354, 799-807.

- LOW, A., CHANDRASHEKARAN, I. R., ADDA, C. G., YAO, S., SABO, J. K., ZHANG, X., SOETOPO, A., ANDERS, R. F. & NORTON, R. S. 2007. Merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum*: Expression, structure, dynamics, and fibril formation of the conserved N-terminal domain. *Biopolymers*, 87, 12-22.
- LUXEMBURGER, C., NOSTEN, F., KYLE, D. E., KIRICHAROEN, L., CHONGSUPHAJAISIDDHI, T. & WHITE, N. J. 1998. Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in an area of low transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 45-49.
- MACDONALD, G. 1955. The measurement of malaria transmission. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 48, 295.
- MACKINNON, M. & READ, A. 1999. Selection for high and low virulence in the malaria parasite. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266, 741-748.
- MAKLER, M., PALMER, C. & AGER, A. 1998. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 92, 419-433.
- MARSH, K. & KINYANJUI, S. 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite immunology*, 28, 51-60.
- MARSH, K. & SNOW, R. W. 1997. Host—parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 352, 1385-1394.
- MBUGI, E. V., MUTAYOBA, B. M., BALTHAZARY, S. T., MALISA, A. L., NYAMBO, T. B. & MSHINDA, H. 2006. Multiplicity of infections and level of recrudescence in *Plasmodium falciparum* malaria in Mlimba, Tanzania. *African Journal of Biotechnology*, 5.
- MÉNARD, D., KHIM, N., BEGHAIN, J., ADEGNIKA, A. A., SHAFIUL-ALAM, M., AMODU, O., RAHIM-AWAB, G., BARNADAS, C., BERRY, A. & BOUM, Y. 2016. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *New England Journal of Medicine*, 374, 2453-2464.
- MENEGON, M., SANNELLA, A. R., MAJORI, G. & SEVERINI, C. 2008. Detection of novel point mutations in the *Plasmodium falciparum* ATPase6 candidate gene for resistance to artemisinins. *Parasitology international*, 57, 233-235.
- MENS, P., DE BES, H., SONDO, P., LAOCHAN, N., KEEREECHAROEN, L., VAN AMERONGEN, A., FLINT, J., SAK, J., PROUX, S. & TINTO, H. 2012. Direct blood PCR in combination with nucleic acid lateral flow immunoassay for detection of *Plasmodium* species in settings where malaria is endemic. *Journal of clinical microbiology*, 50, 3520-3525.

MEREMIKWU, M., ALARIBE, A., EJEMOT, R., OYO-ITA, A., EKENJOKU, J., NWACHUKWU, C., ORDU, D. & EZEDINACHI, E. 2006. Artemether-lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for treating uncomplicated childhood malaria in Nigeria: randomized controlled trial. *Malaria Journal*, 5, 43.

METSELAAR, D. & VAN THIEL, P. 1959. Classification of malaria. *Tropical and Geographical Medicine*, 11, 157-61.

MEYBOOM, R. & ROYER, R. 1992. Causality classification at pharmacovigilance centres in the European Community. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 1, 87-97.

MILLER, J. M., SHALLCROSS, L., RINGWALD, P., SEIBER, E. & ORGANIZATION, W. H. 2005. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring 1996-2004.

MOORTHY, V. S., GOOD, M. F. & HILL, A. V. 2004. Malaria vaccine developments. *The Lancet*, 363, 150-156.

MOORTHY, V. S. & OKWO-BELE, J.-M. 2015. Final results from a pivotal phase 3 malaria vaccine trial. *The Lancet*.

Ministère de la Santé du Burkina Faso 2006a: Plan Stratégique 2006-2010 du lutte contre le paludisme au Burkina Faso.

Ministère de la Santé du Burkina Faso 2006b. PNL: Directives Nationales pour la prise en charge du paludisme au Burkina Faso.

Ministère de la Santé du Burkina Faso 2012. Ministère de la santé du Burkina Faso: Direction Générale de l'Information et des statistiques sanitaires.

Ministère de la Santé du Burkina Faso 2013. Plan d'action 2014 du District Sanitaire de Nanoro.

MUGITTU, K., ADJUIK, M., SNOUNOU, G., NTOUMI, F., TAYLOR, W., MSHINDA, H., OLLIARO, P. & BECK, H. P. 2006. Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of *Plasmodium falciparum* malaria conducted in Sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. *Tropical Medicine & International Health*, 11, 1350-1359.

MUNGTHIN, M., KHOSITNITHIKUL, R., SITTHICHOT, N., SUWANDITTAKUL, N., WATTANAVEERADEJ, V., WARD, S. A. & NA-BANGCHANG, K. 2010. Association between the pfmdr1 gene and in vitro artemether and lumefantrine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83, 1005-1009.

NDIAYE, J. L., RANDRIANARIVELOJOSIA, M., SAGARA, I., BRASSEUR, P., NDIAYE, I., FAYE, B., RANDRIANASOLO, L., RATSIMBASOA, A., FORLEMU, D. & MOOR, V. A. 2009. Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ—a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria journal*, 8, 125.

NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cell & developmental biology*, 2001. Elsevier, 215-223.

NOEDL, H., BRONNERT, J., YINGYUEN, K., ATTLMAYR, B., KOLLARITSCH, H. & FUKUDA, M. 2005. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 3575-3577.

NOEDL, H., SOCHEAT, D. & SATIMAI, W. 2009. Artemisinin-resistant malaria in Asia. *New England Journal of Medicine*, 361, 540-541.

OCHONG, E. O., VAN DEN BROEK, I. V., 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 69, 184-187.

OGUIKE, M. C., BETSON, M., BURKE, M., NOLDER, D., STOTHARD, J. R., KLEINSCHMIDT, I., PROIETTI, C., BOUSEMA, T., NDOUNGA, M. & TANABE, K. 2011. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *International journal for parasitology*, 41, 677-683.

OYAKHIROME, S., PÖTSCHKE, M., SCHWARZ, N. G., DÖRNEMANN, J., LAENGIN, M., SALAZAR, C. O., LELL, B., KUN, J., KREMSNER, P. G. & GROBUSCH, M. P. 2007. Artesunate-amodiaquine combination therapy for falciparum malaria in young Gabonese children. *Malar J*, 6, 29.

PHYO, A. P., NKHOMA, S., STEPNIEWSKA, K., ASHLEY, E. A., NAIR, S., MCGREADY, R., LER MOO, C., AL-SAAI, S., DONDORP, A. M. & LWIN, K. M. 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*, 379, 1960-1966.

POUVELLE, B., BUFFET, P., LEPOLARD, C., SCHERF, A. & GYSIN, J. 2000. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes. *Nature medicine*, 6, 1264-1268.

PRADINES, B., DORMOI, J., BRIOLANT, S., BOGREAUX, H. & ROGIER, C. 2010. La résistance aux antipaludiques. *Revue francophone des laboratoires*, 2010, 51-62.

PRICE, R. N., NOSTEN, F., LUXEMBURGER, C., TER KUILE, F., PAIPHUN, L., CHONGSUPHAJASIDDHI, T. & WHITE, N. 1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *The Lancet*, 347, 1654-1658.

PRUDÊNCIO, M., RODRIGUEZ, A. & MOTA, M. M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 849-856.

RAJ, D. K., MU, J., JIANG, H., KABAT, J., SINGH, S., SULLIVAN, M., FAY, M. P., MCCUTCHAN, T. F. & SU, X.-Z. 2009. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 7687-7696.

RANFORD-CARTWRIGHT, L., TAYLOR, J., UMASUNTHAR, T., TAYLOR, L., BABIKER, H., LELL, B., SCHMIDT-OTT, J., LEHMAN, L., WALLIKER, D. & KREMSNER, P. 1997. Molecular analysis of recrudescence parasites in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 719-724.

RICH, S. M., HUDSON, R. R. & AYALA, F. J. 1997. *Plasmodium falciparum* antigenic diversity: evidence of clonal population structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13040-13045.

RIECKMANN, K., CAMPBELL, G., SAX, L. & EMA, J. 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an in-vitro microtechnique. *The Lancet*, 311, 22-23.

RIECKMANN, K. H., MCNAMARA, J. V., FRISCHER, H., STOCKERT, T. A., CARSON, P. E. & POWELL, R. D. 1968. Effects of chloroquine, quinine, and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 17, 661-71.

ROBERT, V. & BOUDIN, C. 2003. [Biology of man-mosquito *Plasmodium* transmission]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)*, 96, 6-20.

ROWE, J. A., CLAESSENS, A., CORRIGAN, R. A. & ARMAN, M. 2009. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e16.

SCHWÖBEL, B., ALIFRANGIS, M., SALANTI, A. & JELINEK, T. 2003. Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* in vitro and in vivo: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential in vivo resistance marker. *Malaria journal*, 2, 1.

SHANKS, G. D., OLOO, A. J., ALEMAN, G. M., OHRT, C., KLOTZ, F. W., BRAITMAN, D., HORTON, J. & BRUECKNER, R. 2001. A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical infectious diseases*, 33, 1968-1974.

SIALA, E., ABDALLAH, R. B., BOURATBINE, A. & AOUN, K. 2010. Actualites du diagnostic biologique du paludisme current biological diagnosis of malaria. *Revue Tunisienne d'Infectiologie-Janvier*, 4, 5-9.

SINGH, B., SUNG, L. K., MATUSOP, A., RADHAKRISHNAN, A., SHAMSUL, S. S., COX-SINGH, J., THOMAS, A. & CONWAY, D. J. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363, 1017-1024.

SINNIS, P. & WELLEMS, T. E. 1988. Long-range restriction maps of *Plasmodium falciparum* chromosomes: crossingover and size variation among geographically distant isolates. *Genomics*, 3, 287-295.

SISOWATH, C., PETERSEN, I., VEIGA, M. I., MÅRTENSSON, A., PREMJI, Z., BJÖRKMAN, A., FIDOCK, D. A. & GIL, J. P. 2009. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible pfprt K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 750-757.

SISOWATH, C., STRÖMBERG, J., MÅRTENSSON, A., MSELLEM, M., OBONDO, C., BJÖRKMAN, A. & GIL, J. P. 2005. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *Journal of Infectious Diseases*, 191, 1014-1017.

SNOUNOU, G., ZHU, X., SIRIPOON, N., JARRA, W., THAITHONG, S., BROWN, K. N. & VIRIYAKOSOL, S. 1999. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 369-374.

SOMÉ, A. F., SÉRÉ, Y. Y., DOKOMAJILAR, C., ZONGO, I., ROUAMBA, N., GREENHOUSE, B., OUÉDRAOGO, J.-B. & ROSENTHAL, P. J. 2010. Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperazine in Burkina Faso. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 1949-1954.

SONDO, P., BIEBO, B., KAZIENGA, A., VALEA, I., SORGHO, H., OUEDRAOGO, J.-B., GUIGUEMDÉ, T. R. & TINTO, H. 2015a. The part of malaria among febrile diseases during the dry season in Nanoro area, Burkina Faso. *West African Journal of Research for Health*.

SONDO, P., DERRA, K., DIALLO-NAKANABO, S., TARNAGDA, Z., ZAMPA, O., KAZIENGA, A., VALEA, I., SORGHO, H., OWUSU-DABO, E. & OUEDRAOGO, J.-B. 2015b. Effectiveness and safety of artemether–lumefantrine versus artesunate–amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria Journal*, 14, 325.

SONDO, P., DERRA, K., TARNAGDA, Z., NAKANABO, S. D., ZAMPA, O., KAZIENGA, A., VALEA, I., SORGHO, H., OUEDRAOGO, J.-B. & GUIGUEMDE, T.

R. 2015c. Dynamic of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene Pfcrt K76T mutation five years after withdrawal of chloroquine in Burkina Faso. *Pan African Medical Journal*, 21.

TA, T. H., HISAM, S., LANZA, M., JIRAM, A. I., ISMAIL, N. & RUBIO, J. M. 2014. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria journal*, 13, 1.

TAKALA, S. L. & PLOWE, C. V. 2009. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming vaccine resistant malaria. *Parasite immunology*, 31, 560-573.

TALISUNA, A. O., NALUNKUMA-KAZIBWE, A., LANGI, P., MUTABINGWA, T. K., WATKINS, W. W., VAN MARCK, E., EGWANG, T. G. & D'ALESSANDRO, U. 2004. Two mutations in dihydrofolate reductase combined with one in the dihydropteroate synthase gene predict sulphadoxine-pyrimethamine parasitological failure in Ugandan children with uncomplicated falciparum malaria. *Infection, genetics and evolution*, 4, 321-327.

TANABE, K., SAKIHAMA, N., KANEKO, O., SAITO-ITO, A. & KIMURA, M. 1998. A PCR method for molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* msp-1. *Tokai journal of experimental and clinical medicine*, 23, 375-382.

TINTO, H., BONKIAN, L. N., NANA, L. A., YERBANGA, I., LINGANI, M., KAZIENGA, A., VALÉA, I., SORGHO, H., KPODA, H. & GUIGUEMDÉ, T. R. 2014a. Ex vivo anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malaria journal*, 13, 207.

TINTO, H., DIALLO, S., ZONGO, I., GUIRAUD, I., VALEA, I., KAZIENGA, A., KPODA, H., SORGHO, H., OUEDRAOGO, J. B. & GUIGUEMDE, T. R. 2014b. Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*, 19, 469-475.

TINTO, H., GUEKOUN, L., ZONGO, I., GUIGUEMDE, R. T., D'ALESSANDRO, U. & OUEDRAOGO, J. B. 2008. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*, 13, 238-40.

TINTO, H., OUEDRAOGO, J. B., ZONGO, I., VAN OVERMEIR, C., VAN MARCK, E., GUIGUEMDE, T. R. & 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76, 608-613.

TINTO, H., SANOU, B., DUJARDIN, J.-C., OUEDRAOGO, J. B., VAN OVERMEIR, C., ERHART, A., VAN MARCK, E., GUIGUEMDE, T. R. & D'ALESSANDRO, U. 2005. Usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73, 171-173.

TJITRA, E., SUPRIANTO, S., DYER, M., CURRIE, B. J. & ANSTEY, N. M. 1999. Field Evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv Immunochromatographic Test for Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Patients with a Presumptive Clinical Diagnosis of Malaria in Eastern Indonesia. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2412-2417.

TRAMPUZ, A., JEREB, M., MUZLOVIC, I. & PRABHU, R. M. 2003. Clinical review: Severe malaria. *Critical care*, 7, 1.

TRAPE, J.-F. 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 64, 12-17.

URSING, J., ZAKERI, S., GIL, J. & BJÖRKMAN, A. 2006. Quinoline resistance associated polymorphisms in the pfprt, pfmdr1 and pfmrp genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta tropica*, 97, 352-356.

VENKATESAN, M., GADALLA, N. B., STEPNIEWSKA, K., DAHAL, P., NSANZABANA, C., MORIERA, C., PRICE, R. N., MÅRTENSSON, A., ROSENTHAL, P. J. & DORSEY, G. 2014. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91, 833-843.

VERDRAGER, J. 1986. Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in Southeast Asia. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 17, 111-118.

WEBER, J. L. 1987. Analysis of sequences from the extremely A+ T-rich genome of *Plasmodium falciparum*. *Gene*, 52, 103-109.

WERNSDORFER, W. H. 1994. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta tropica*, 56, 143-156.

WHITE, N. J. 2005. Intermittent presumptive treatment for malaria. *PLoS Med*, 2, e3.

WHITE, N. J., VAN VUGT, M. & EZZET, F. D. 1999. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clinical pharmacokinetics*, 37, 105-125.

WHO 1973. Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques: rapport d'un groupe scientifique de l'OMS [réuni à Genève du 17 au 24 octobre 1972].

WHO 1989. Guidelines for the evaluation of *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage vaccines in populations exposed to natural infection.

WHO 1992. International monitoring of adverse reactions to drugs: adverse

reaction terminology. WHO Collaborating Centre for International

Drug Monitoring, Uppsala, Sweden. Uppsala, Swede.

WHO 2001. Antimalarial drug combination therapy: report of a technical consultation. . Geneva.

WHO 2003a. Assessment of Therapeutic Efficacy of Antimalarial Drugs for Uncomplicated Falciparum Malaria WHO/HTM/RBM/. Geneva, Switzerland.

WHO 2003b. Toxicity grading scale for determining the severity of adverse events. 2003.

WHO 2006. *Guidelines for the treatment of malaria*, World Health Organization.

WHO 2015a. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition.

WHO 2015b. World Malaria Report. Geneva.

WHO 2016. World Malaria Report. Geneva.

WITKOWSKI, B., AMARATUNGA, C., KHIM, N., SRENG, S., CHIM, P., KIM, S., LIM, P., MAO, S., SOPHA, C. & SAM, B. 2013. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *The Lancet infectious diseases*, 13, 1043-1049.

WONGSRICHANALAI, C., BARCUS, M. J., MUTH, S., SUTAMIHARDJA, A. & WERNSDORFER, W. H. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77, 119-127.

YAVO, W., KONATÉ, A., KASSI, F. K., DJOHAN, V., ANGORA, E. K., KIKI-BARRO, P. C., VANGA-BOSSON, H. & MENAN, E. I. H. 2015. Efficacy and safety of Artesunate-Amodiaquine versus Artemether-Lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in sentinel sites across Côte d'Ivoire. *Malaria research and treatment*, 2015.

YAZDANI, S., MUKHERJEE, P., CHAUHAN, V. & CHITNIS, C. 2006. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Current molecular medicine*, 6, 187-203.

ZONGO, I., DORSEY, G., ROUAMBA, N., DOKOMAJILAR, C., SÉRÉ, Y., ROSENTHAL, P. J. & OUÉDRAOGO, 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. *Clinical infectious diseases*, 45, 1453-1461.

ZONGO, I., DORSEY, G., ROUAMBA, N., TINTO, H., DOKOMAJILAR, C., GUIGUEMDE, R. T., ROSENTHAL, P. J. & OUEDRAOGO, J. B. 2007b. Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. *The Lancet*, 369, 491-498.

Annexes

Annexe 1: Procédure d'extraction de l'ADN plasmodial à partir des confettis par la méthode du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)

- Découper les confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux décontaminés puis introduire le petit morceau dans un tube de 1,5 ml et y ajouter 180 µl de Buffer ATL. La décontamination se fait par trempage et rinçage des ciseaux dans quatre solutions successivement: (i) eau de javel, (ii) eau distillée, (iii) eau distillée, (iv) méthanol.
- Incuber à 85°C pendant 10 minutes puis centrifuger brièvement pour recueillir les gouttelettes au niveau du couvercle.
- Y ajouter 20 µl de Protéinase K. Homogénéiser en vortexant puis incuber à 56°C pendant 1h. Centrifuger brièvement pour recueillir les gouttelettes au niveau du couvercle.
- Y ajouter 200 µl de Buffer AL. Mélanger doucement en vortexant puis incuber à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour recueillir les gouttelettes au niveau du couvercle.
- Y ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) puis mélanger doucement en vortexant. Centrifuger brièvement pour recueillir les gouttelettes au niveau du couvercle.
- Transférer soigneusement le mélange sur la colonne QIAamp DNA Mini Kit contenue dans un tube de collection de 2ml sans mouiller les parois. Refermer la capsule puis centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute. Replacer la colonne.
- Ouvrir soigneusement la colonne QIAamp DNA Mini kit puis ajouter 500 µl de Buffer AW1 sans mouiller les bords. Refermer la capsule puis centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute. Placer ensuite la colonne QIamp DNA Mini Kit dans un nouveau tube de collection (fourni avec le kit) puis se débarrasser du filtrat.
- Ouvrir soigneusement la colonne QIAamp DNA Mini Kit puis y ajouter 500ul de Buffer AW2 sans mouiller les bords. Refermer la capsule puis centrifuger à grande vitesse (20000 x g ; 14000 rpm) pendant 3 minutes.
- Il est recommandé de placer la colonne QIAamp Mini Kit dans un autre tube de collecte (non fourni avec le kit) puis se débarrasser de l'ancien contenant le filtrat. Centrifuger à grande vitesse (20000 x g ; 14000 rpm) encore pendant 1 minute.

- Placer la colonne QIAamp DNA Mini Kit dans un tube Eppendorf stérile (non fourni avec le Kit) et se débarrasser du tube de collecte contenant le filtrat.
- Ouvrir soigneusement la colonne QIAamp DNA Mini Kit puis y ajouter 150 µl de Buffer AE ou de l'eau distillée.
- Laisser agir 1 minute à température de laboratoire (température de la salle), puis centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute. L'ADN est recueilli dans des tubes Eppendorfs de 1,5 ml bien étiquetés puis conservé à -20°C.

Annexe 2: Liste et code à une et trois lettres des acides aminés

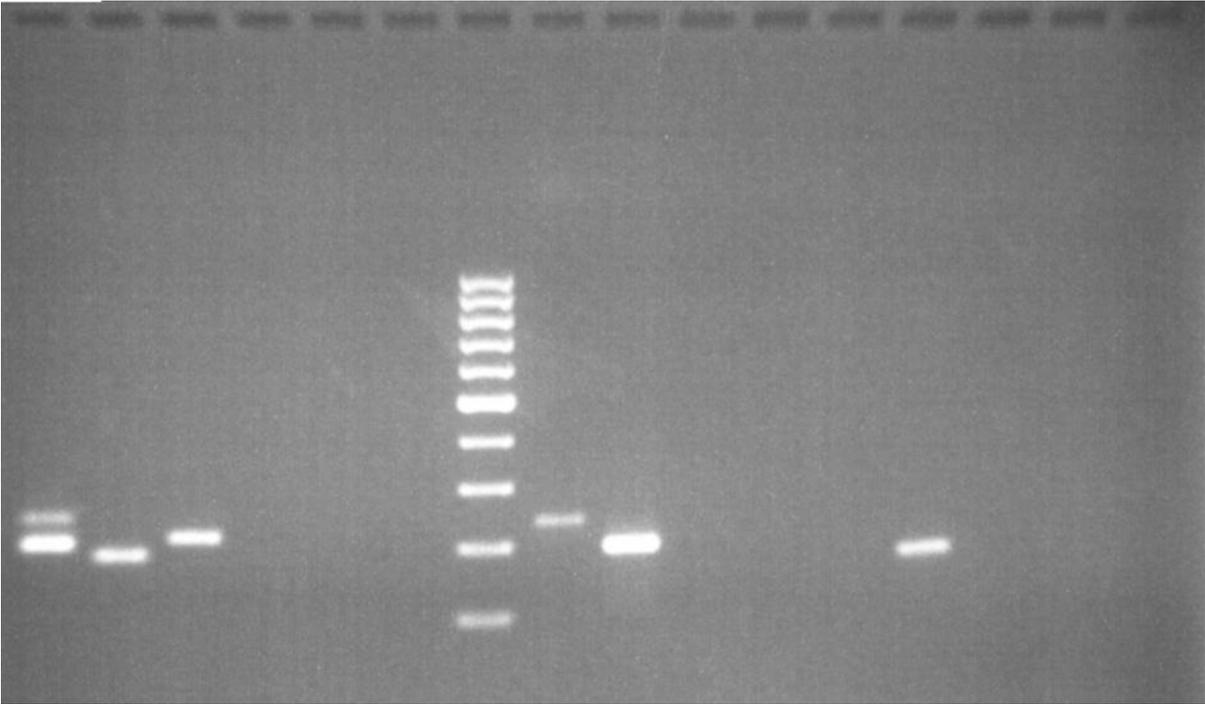
Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Annexe 3: Guide pour la gradation des symptômes (WHO, 2003b)

	Grade 1 MINEUR	Grade 2 MODERE	Grade 3 SEVERE	Grade 4 TRES SEVERE
<i>Asthénie</i>	Diminution légère d'activité, joue toujours	Diminution modérée d'activité, joue moins	Ne participe pas aux activités habituelles, ne joue pas	Léthargique
<i>Céphalées*</i>	Légères, ne nécessitent pas de traitement	Traitement nécessaire	Sévère; répond au traitement narcotique	Intraitable; nécessite traitement narcotique répété
Vertiges	Sensations d'ébriété sans troubles de l'équilibre à la station debout	Sensation d'ébriété avec léger tangage à la station debout	Grands vertiges rotatoires provoquant la chute à la station debout sans appui	Grands vertiges rotatoires avec décubitus forcé
Douleurs abdominales*	Inconfort gastrique, spasmes intestinaux légers. Pas de traitement	Douleurs abdominales modérées répondant au traitement antispasmodique oral	Nécessitant des doses répétées d'antispasmodiques	Sévère-hospitalisé pour traitement IV
Anorexie	Appétit diminué mais prends toujours de la nourriture solide	Appétit diminué, évite nourriture solide	Refuse de téter, appétit très diminué, pas de nourriture ou liquides pris (<2ans≤12h;>2 ans≤24h	N/A
Nausées	Légères nausées, s'alimente toujours	Nausées modérées avec diminution de l'appétit	Nausées importantes avec anorexie	Nausées très importantes avec anorexie et vomissements
Vomissements	Occasionnel	Vomissement répétés dans la journée	Vomissements répétés avec hypotension orthostatique et nécessitant réhydratation IV	Choc hypotensif ou hospitalisation nécessaire pour réhydratation IV
Diarrhées	3-4 selles liquides/jour	5-7 selles liquides/jour	Hypotension orthostatique ou > 7 selles liquides/jour ou réhydratation IV nécessaire	Choc hypotensif ou hospitalisation nécessaire pour réhydratation IV
Douleur musculaire ou articulaire*	Légères, plaintes localisées	Moyennes, plaintes diffuses	Douleurs aiguës avec diminution objective de la force musculaire ou amplitude articulaire	N/A
Toux	Occasionnelle, pas de traitement nécessaire	Continue, traitement nécessaire	Non contrôlée avec dyspnée et limitation des activités	Cyanoses, stridor, Dyspnée sévère
Prurit	Prurit sans rash	Rash ou prurit sans rash mais qui empêche de dormir	Urticaire moyenne	Urticaire sévère, anaphylaxie, angiodème
Acouphène*	Léger sifflement ou roaring sound	Sifflement modéré ou roaring sound	Sifflement sévère ou roaring sound associé à perte d'ouïe	N/A
Troubles de comportement	Confusion ou agitation moyenne ; activités journalières normales ; pas de traitement	Confusion ou agitation modérées ; activités journalières légèrement limitées, traitement minime	Confusion ou agitation sévère ; Assistance nécessaires pour les activités journalières ; traitement nécessaire	Psychose ; hospitalisation nécessaire
Syndrome grippal	Congestion nasale moyenne, rhinorrhée moyenne, pas de toux	Congestion nasale modérée, rhinorrhée modérée, toux présente	N/A	N/A

*Seulement chez les enfants âgés ≥ 3 ans

Annexe 4: Photo PCR prise le 04/03/13 (e) de la famille allélique MAD20 de *msp1*



Puits 1: échantillon positif avec 2 génotypes parasites

Puits 2, 3, 8 et 9: échantillons positifs avec un génotype parasite chacun

Puits 4, 5, 6, 10, 11 et 12: échantillons négatifs pour cette famille allélique

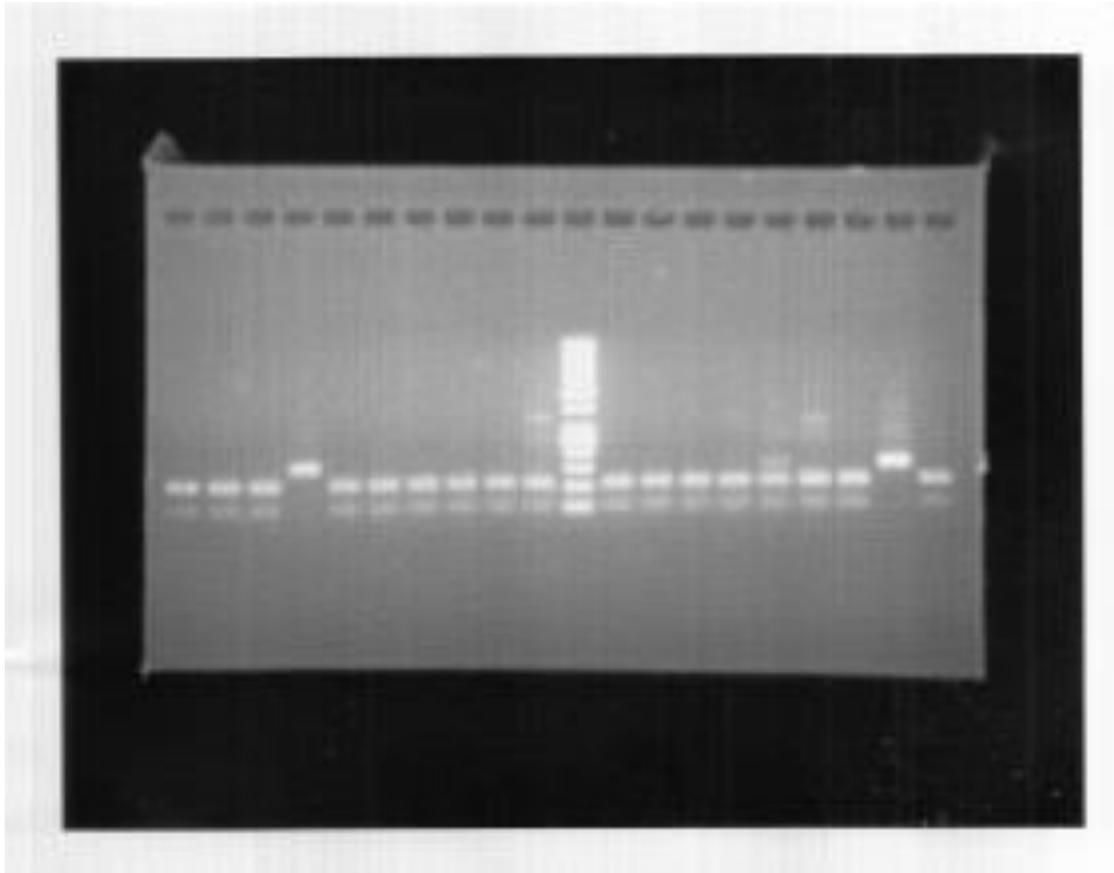
Puits 13: D10 (Contrôle positif de la famille allélique)

Puits 7: marqueur de Poids moléculaire de 100pb

Puits 14, 15: contrôle négatif

Puits 16: mix (mélange réactionnel de la PCR).

Annexe 5: Photo PCR prise le 03/02/14 (f) pour la détection de la mutation *Pfert*



Puits 1-3, 5-10, 12-15, 17 et 18: échantillons positifs de type sauvage

Puits 4: échantillon positif de type mutant

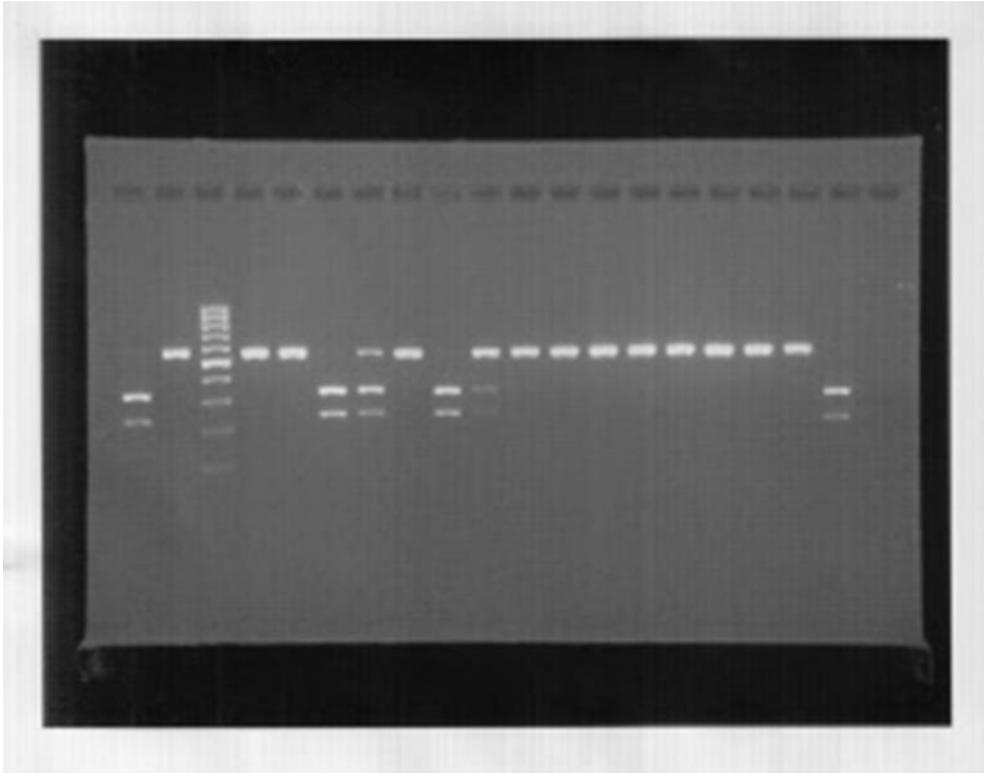
Puits 11: marqueur de Poids moléculaire de 50pb

Puits 16: échantillon positif mixte (portant à la fois l'allèle sauvage et l'allèle mutant)

Puits 19: contrôle mutant (7G8)

Puits 20: contrôle sauvage (3D7)

**Annexe 6: Photo PCR prise le 16/04/14 (d) pour la détection de la mutation *Pfmdr1*
N86Y**



Puits 1: échantillon positif de type mutant

Puits 2, 4, 5, 8 et 11-17: échantillons positifs de type sauvage

Puits 3: marqueur de Poids moléculaire de 100pb

Puits 6, 9: échantillons positifs de type mutant

Puits 7 et 10: échantillons positifs mixtes

Puits 18: contrôle sauvage (3D7)

Puits 19: contrôle mutant (DD2)

Puits 20: vide

Annexe 7: Liste des publications

I. Publications dans le cadre de la thèse

1. **Paul Sondo**, Karim Derra, Seydou Diallo-Nakanabo, Zékiba Tarnagda, Odile Zampa, Adama Kazienga, Innocent Valéa, Hermann Sorgho, Ellis Owusu-Dabo, Jean-Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé, and Halidou Tinto (2015): Effectiveness and safety of artemether–lumefantrine *versus* artesunate–amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria Journal* 14:325.
2. **Paul Sondo**, Karim Derra, Zékiba Tarnagda, Seydou Diallo Nakanabo, Odile Zampa, Adama Kazienga, Innocent Valéa, Hermann Sorgho, Jean-Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé, Halidou Tinto (2015): Dynamic of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene *Pfcr* K76T mutation five years after withdrawal of chloroquine in Burkina Faso. *PanAfrican Medical Journal* 21.101.6437.
3. **Paul Sondo**, Karim Derra, Seydou Diallo-Nakanabo, Zékiba Tarnagda, Odile Zampa, Adama Kazienga, Innocent Valéa, Hermann Sorgho, Ellis Owusu-Dabo, Jean-Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé, and Halidou Tinto (2016): Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine therapies and selection of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles in Nanoro, Burkina Faso. *PLOS ONE* 11:e0151565.
4. **Paul Sondo**, Karim Derra, Seydou Diallo-Nakanabo, Zékiba Tarnagda, Adama Kazienga, Innocent Valéa, Hermann Sorgho, Jean-Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé, and Halidou Tinto (2016): **High seasonal influence on effectiveness of artemisinin based combination therapies (ACT) in Nanoro, Burkina Faso.** *Article soumis. Annals of Parasitology.*

II. Autres articles publiés au cours de la thèse

1. Mens PF, de Bes HM, **Sondo P**, Laochan N, Keereecharoen L, van Amerongen A, Flint J, Sak JR, Proux S, Tinto H, Schallig HD. (2012) Direct blood PCR in combination with Nucleic Acid Lateral Flow Immuno-Assay for the detection of *Plasmodium* species in malaria endemic settings. *J. Clin. Microbiol.*vol. 50(11) 3520-3525.
2. **Paul Sondo**, Innocent Valéa, Bihoun Biebo, Hermann Sorgho, Adama Kazienga, Jean Bosco Ouédraogo, Tinga Robert Guiguemdé and Halidou Tinto (2015): **La part du paludisme dans les maladies fébriles en saison sèche dans la région de Nanoro, Burkina Faso.** , *West African Journal of research for health* Vol(004)29-32.

RESEARCH

Open Access



Effectiveness and safety of artemether–lumefantrine versus artesunate–amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial

Paul Sondo^{1*}, Karim Derra¹, Seydou Diallo-Nakanabo¹, Zekiba Tarnagda¹, Odile Zampa², Adama Kazienga¹, Innocent Valea^{1,2}, Hermann Sorgho¹, Ellis Owusu-Dabo³, Jean-Bosco Ouedraogo¹, Tinga Robert Guiguemde² and Halidou Tinto^{1,2}

Abstract

Background: Several studies have reported high efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy (ACT) mostly under strict supervision of drug intake and limited to children less than 5 years of age. Patients over 5 years of age are usually not involved in such studies. Thus, the findings do not fully reflect the reality in the field. This study aimed to assess the effectiveness and safety of ACT in routine treatment of uncomplicated malaria among patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso.

Methods: A randomized open label trial comparing artesunate–amodiaquine (ASAQ) and artemether–lumefantrine (AL) was carried out from September 2010 to October 2012 at two primary health centres (Nanoro and Nazoanga) of Nanoro health district. A total of 680 patients were randomized to receive either ASAQ or AL without any distinction by age. Drug intake was not supervised as pertains in routine practice in the field. Patients or their parents/guardians were advised on the time and mode of administration for the 3 days treatment unobserved at home. Follow-up visits were performed on days 3, 7, 14, 21, and 28 to evaluate clinical and parasitological resolution of their malaria episode as well as adverse events. PCR genotyping of merozoite surface proteins 1 and 2 (*mSP-1*, *mSP-2*) was used to differentiate recrudescence and new infection.

Results: By day 28, the PCR corrected adequate clinical and parasitological response was 84.1 and 77.8 % respectively for ASAQ and AL. The cure rate was higher in older patients than in children under 5 years old. The risk of re-infection by day 28 was higher in AL treated patients compared with those receiving ASAQ ($p < 0.00001$). Both AL and ASAQ treatments were well tolerated.

Conclusion: This study shows a lowering of the efficacy when drug intake is not directly supervised. This is worrying as both rates are lower than the critical threshold of 90 % required by the WHO to recommend the use of an anti-malarial drug in a treatment policy.

*Correspondence: paulsondo@yahoo.fr

¹ IRSS, Clinical Research Unit of Nanoro (CRUN), CMA Saint Camille of Nanoro, BP 218 Ouagadougou CMS 11, Nanoro, Burkina Faso
Full list of author information is available at the end of the article

Short communication

Dynamic of plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene Pfcrt K76T mutation five years after withdrawal of chloroquine in Burkina Faso

Paul Sondo¹, Karim Derra¹, Zekiba Tarnagda¹, Seydou Diallo Nakanabo¹, Odile Zampa², Adama Kazienga¹, Innocent Valea^{1,2}, Hermann Sorgho¹, Jean-Bosco Ouedraogo¹, Tinga Robert Guiguemde², Halidou Tinto^{1,2,&}

¹IRSS, Clinical Research Unit of Nanoro, CMA Saint Camille de Nanoro, Ouagadougou CMS 11, Burkina Faso, ²Center Muraz of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

[&]Corresponding author: Halidou Tinto, IRSS, Clinical Research Unit of Nanoro, CMA Saint Camille de Nanoro, Ouagadougou CMS 11, Burkina Faso

Key words: Malaria, plasmodium falciparum, chloroquine resistance, pfcrt

Received: 26/02/2015 - Accepted: 18/04/2015 - Published: 09/06/2015

Abstract

We investigated the evolution of Pfcrt K76T mutation five years after the withdrawal of chloroquine in Burkina Faso. A total of 675 clinical isolates collected from October 2010 to September 2012 were successfully genotyped. Single nucleotide polymorphism in Pfcrt (codon 76) gene was analyzed. The prevalence of resistant Pfcrt 76T allele was 20.55%. There was a progressive decrease of the proportion of mutant type pfcrt T76 from 2010 to 2012 ($X^2=5.508$ $p=0.0189$). Our results suggest a progressive return of the wild type Pfcrt K76 in Burkina Faso but the prevalence of the mutants Pfcrt T76 still remains high.

Pan African Medical Journal. 2015; 21:101 doi:10.11604/pamj.2015.21.101.6437

This article is available online at: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/21/101/full/>

© Paul Sondo et al. The Pan African Medical Journal - ISSN 1937-8688. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Like several malaria endemic countries, Artesunate-Amodiaquine (ASAQ) and Artemether-Lumefantrine (AL) are the two combinations recommended in Burkina Faso for the treatment of uncomplicated malaria since the change of the national policy in 2005. Nevertheless recently, there were reports on the decreasing sensitivity of ACTs recorded along the Thailand and Myanmar border [1]. More recently a study conducted in Burkina Faso showed a high Lumefantrine inhibition concentration (IC50) five years after the policy change, suggesting a decreasing efficacy of one of the two artemisinin based combination therapies (ACTs) recommended in the country [2]. In such context the development of alternative therapies is needed to anticipate the worldwide expansion of the ACTs resistance reported in Asia. That includes the use of old drugs such as chloroquine (CQ) in combination with partner drugs. Indeed the combination Chloroquine-Azithromycin has showed promising results in pregnant women [3,4]. This is particularly important in a context where few studies particularly in Malawi and Kenya showed that CQ resistance (CQ-R) decreases few years after its withdrawal and its replacement by ACTs [5-7]. These findings raise the issue of the reintroduction of chloroquine in the panel of potential alternative therapies face to ACTs resistance in the future. In such context there is a need of investigating the evolution of CQ-R to document its sensitivity profile. However currently there is an ethical issue of testing CQ in vivo in patients while a good efficacy of ACTs is still reported [8]. The only existing tools to overcome this problem is either the ex vivo test or testing the CQ-R molecular markers and particularly the Pfcr gene [9]. However, due to technical constraints of ex vivo tests, the latter seems to be the more appropriate tool. Thus our aim in this study was to investigate the prevalence of Pfcr K76T mutation five years after the policy change in Burkina Faso.

Methods

The study was carried out from October 2010 to September 2012 at two peripheral health facilities (Nanoro and Nazoanga) of the Nanoro health district (NHD) in Burkina Faso. This is part of a study entitled: "Pharmacovigilance for artemisinin-based combination treatments in Africa" which had one component aiming at assessing the effectiveness of artesunate-amodiaquine (Arsucam®) versus artemether-lumefantrine (Coartem®) with a molecular analysis of resistance markers nested to it. Details of the study methodology

have been described in detail elsewhere (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01232530). For the current analysis, clinical isolates from day 0 were genotyped. DNA was extracted from dried blood spots using Qiagen Kit and restriction fragment length polymorphism was used to detect the Pfcr K76T mutation. Data were analyzed using STATA 8 (Stata Corp. 2003). A Chi-square test was used to assess the temporal fluctuation of the proportions. A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant. The study was approved by Center Muraz Institutional Ethics Committee, Burkina Faso National Ethics Committee.

Results

Overall, 675 blood samples were genotyped. Ninety one samples (13.48%) carrying both wild and mutant Pfcr alleles and for which related frequencies could not be determined were excluded. The prevalence of wild type PfcrK76 was 79.45 % (464/584). The proportion of mutant type Pfcr T76 was 20.55% (120/584). The temporal evolution of Pfcr codon 76 genotype profiles showed a decrease of the prevalence of the mutant type while those of the wild type increased progressively (**Figure 1**). From 2010 to 2012, the prevalence of the mutants Pfcr T76 dropped from 27.22% (46/169) to 16.49% (16/97) while the prevalence of the wild type PfcrK76 increased from 72.78% (123/169) to 83.51% (81/97) showing then a resurgence of CQ sensitive *P. falciparum* isolates in Nanoro area ($X^2=5.508$ $p=0.0189$).

Discussion

Our study aimed at assessing if parasites resistance profile has been affected by the implementation of the new treatment policies. Before the policy change, several studies have reported a high level of mutants Pfcr T76 allele up to 65% in the country [10]. This study shows a decrease of this mutation five years after the withdrawal of chloroquine. Indeed, the prevalence reported in our study represents about half of that reported five years earlier and confirms the decrease of ex vivo CQ-R rate reported by Tinto et al in Bobo-Dioulasso at the same period [2]. These findings suggest that CQ-R may be decreasing following the implementation of the new anti-malarial drug policy using ACTs in Burkina Faso. Similar findings have been reported in many African countries and particularly in Malawi where, no CQ-R was found nine years after the withdrawal

of CQ [5,6]. Nevertheless, the proportion reported in our study is still high compared to that reported in Malawi. This difference can be explained by several factors including the short duration between the introduction of the new treatment policy and our study which occurred only five years later when in Malawi it was nine years. In addition the use of Amodiaquine as partner drug in the combination ASAQ that is widely used in the country could lead to a selective pressure of Pfcr t76 mutant allele due to its similar chemical structure with chloroquine. Indeed the positive correlation between ex vivo IC50 values of CQ and amodiaquine reported by several authors and more recently by Tinto et al in Bobo-Dioulasso at the same period indicates cross-resistance and may also explain the still high prevalence of the mutant allele found in this study [2].

Conclusion

There is a progressive return of the wild type Pfcr t76 in Burkina Faso but the prevalence of the mutants Pfcr t76 is still high. Considering that, the possible reintroduction of CQ in the potential panel of alternative treatments in Burkina Faso could not actually be recommended.

Competing interests

The authors declare no competing interest.

Authors' contributions

Paul Sondo, Karim Derra, Zekiba Tarnagda, Seydou Diallo Nakanabo, Odile Zampa, Adama Kazienga, Innocent Valea, Hermann Sorgho, Jean-Bosco Ouedraogo, Tinga Robert Guiguemde, Halidou Tinto Tinto Halidou, Sondo Paul, Jean-Bosco Ouedraogo, Innocent Valea, Tinga Robert Guiguemde, DK, Zekiba Tarnagda, HS designed the study, Tinto Halidou, Sondo Paul, DK, Zekiba Tarnagda, Seydou Diallo Nakanabo, HS contributed for data collection and supervision of the study in the field. Sondo Paul, Odile Zampa carried out the laboratory analyses, Adama Kazienga carried out the data management, Sondo Paul, Tinto Halidou draft the manuscript and all authors read and approved the manuscript. All authors have read and agreed to the final version of this manuscript

and have equally contributed to its content and to the management of the case.

Acknowledgments

We thank the study participants and the staff of the Nanoro Health District for their support. We are grateful to Sanofi Aventis and WHO-TDR for the financial support of the study. We are also grateful to the Institute of Tropical Medicine, Belgium (FA3-DGCD program) for the financial support of the laboratory work.

Figure

Figure 1: Temporal evolution of Pfcr t76 genotypes profiles; the figure 1 represents the temporal evolution of Pfcr t76 genotypes profiles from 2010 to 2012. The figure shows a progressive decrease of the mutants Pfcr t76 (in red) whilst an increase of the wild type Pfcr t76 (in blue) is observed

References

1. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*. 2012 May 26;379(9830):1960-6. **PubMed | Google Scholar**
2. Tinto H, Bonkian LN, Nana LA, Yerbanga I, Lingani M, Kazienga A et al. Ex vivo anti-malarial drugs sensitivity profile of Plasmodium falciparum field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malar J*. 2014 Jan;13:207. **PubMed | Google Scholar**
3. Chandra RS, Orazem J, Ubben D, Duparc S, Robbins J, Vandebroucke P. Creative solutions to extraordinary challenges in clinical trials: methodology of a phase III trial of azithromycin and chloroquine fixed-dose combination in pregnant women in Africa. *Malar J*. 2013 Apr 11;12:122. **PubMed | Google Scholar**

4. Hand CC, Meshnick SR. Is chloroquine making a comeback? *J Infect Dis.* 2011 Jan 1;203(1):11-2. **PubMed | Google Scholar**
5. Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalama FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine-susceptible falciparum malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis.* 2010 Sep 1;202(5):801-8. **PubMed | Google Scholar**
6. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN et al. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis.* 2003 Jun 15;187(12):1870-5. **PubMed | Google Scholar**
7. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G et al. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J.* 2009 Jan;8:106. **PubMed | Google Scholar**
8. Tinto H, Diallo S, Zongo I, Guiraud I, Valea I, Kazienga A et al. 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 Heal.* 2007 Apr;19(4):469-75. **PubMed | Google Scholar**
9. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med.* 2001;344(4):257-63. **PubMed | Google Scholar**
10. Tinto H, Sanou B, Dujardin JC, Ouédraogo JB, Overmeir CVAN, Erhart A et al. Usefulness of the *plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter t76 genotype failure index for the estimation of in vivo chloroquine resistance in Burkina faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):171-3. **PubMed | Google Scholar**

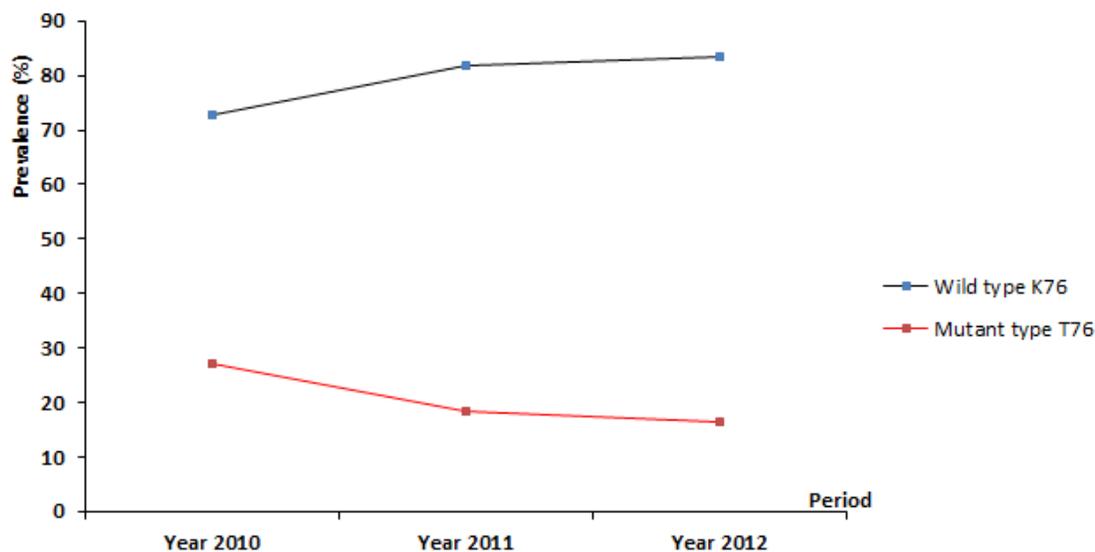


Figure 1: Temporal evolution of Pfcr1 (codon 76) genotypes profiles; the figure 1 represents the temporal evolution of Pfcr1 codon 76 genotypes profiles from 2010 to 2012. The figure shows a progressive decrease of the mutants Pfcr1 T76 (in red) whilst an increase of the wild type Pfcr1K76 (in blue) is observed

Trial registration: NCT01232530

Keywords: Effectiveness, Artesunate–amodiaquine, Artemether–lumefantrine, Unsupervised-treatment, Malaria

Background

Malaria remains the main cause of morbidity and mortality in Burkina Faso. Based on the recommendation of the World Health Organization, artemisinin-based combination therapy (ACT) was adopted by the national malaria control programme (NMCP) for the treatment of uncomplicated malaria since 2005. The two combinations adopted in the country as first-line regimen are artemether–lumefantrine (AL) and artesunate–amodiaquine (ASAQ) [1, 2]. Globally, several efficacy and effectiveness studies have demonstrated their high efficacy and safety for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria [3–5].

However, in most of these studies, drug intake was supervised by a study team and treatment was strictly administered in accordance with manufacturer's recommendations. Yet, in poor resource settings with high malaria morbidity, strict adherence to these conditions is often not observed in real life settings. A recent study conducted in this study area has already shown a lowering of the cure rate of ACT in real life comparative to the other efficacy studies [6]. In addition, most of those studies were limited to children under five and the older populations are typically not involved. Despite the upheld notion that adults are immune-protected, behaviour towards the treatment, such as not completing treatment regimens, could be higher in adults and this could negatively influence treatment outcomes. Therefore, an assessment of treatment outcomes that would fully reflects the reality in the field has to involve all age groups in the population. Moreover, the best indicator for safety could be obtained from adults since children are challenged to make recalls on safety information. It is based on these compelling reasons that this study was carried out in order to assess the effectiveness and safety of the two recommended forms of ACT in Burkina Faso as they are used routinely in treating uncomplicated malaria in all age groups in the country.

Methods

Study area

The study was carried out from September 2010 to October 2012 at two primary health centers (Nanoro and Nazoanga) of Nanoro health district (NHD) in Burkina Faso. Nanoro is situated at about 85 km from Ouagadougou, the capital city of the country. It is classified as hyperendemic and malaria transmission is seasonal with a peak at rainy season that lasts usually from June–July

to October–November [7]. The entomological inoculation rate is estimated at 50–60 infective bites/person/year and the commonest vectors are *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* (A. Diabate, personal communication). *Plasmodium falciparum* is the most prevalent malaria parasite. The predominant ethnic group is Mossi, minorities are Gourounsi and Fulani. The majority of the population practice subsistence farming [8].

Study participants and inclusion criteria

Patients presenting at the two health facilities with symptoms or signs suggestive of malaria were reviewed by study nurses without any age distinction. The inclusion criteria were: (a) fever or history of fever within the previous 24 h, (b) mono infection with *P. falciparum*, (c) parasites density comprised between 2000 and 200,000 asexual forms per microlitre of blood, (d) haemoglobin >5 g/dL. Patients were excluded from the study if they presented (a) danger signs (unable to drink or breast-feed; vomiting more than twice in 24 h; recent history of convulsions; unconsciousness or unable to sit or stand), (b) severe malaria, (c) severe malnutrition (defined as weight for height <70 % of the median NCHS/WHO reference), (d) a documented history of adequate malaria treatment in the preceding 2 weeks, (e) any evidence of chronic disease or of a concurrent non-malarial febrile illness, (f) history of serious side effects with the study drugs, (g) a reported pregnancy for child bearing age women and patient or his parent/guardians unwillingness to participate.

Study procedures

Patients were randomly assigned to receive either AL (Coartem[®], Novartis) or ASAQ (Winthrop, sanofi aventis). A computer-generated randomization list provided by the site quality assurance manager was used for treatment allocation. Treatment was administered according to the national algorithm for malaria cases management and was strictly adhered to. In ASAQ group, treatment was administered once daily, at the standard dose as follows: 4.5 to <9 kg, 1 tablet 25/67.5 mg; 9 to <18 kg, 1 tablet 50/135 mg; 18 to <36 kg, 1 tablet 100/270 mg; ≥36 kg, 2 tablets 100/270 mg. In AL group, treatment was given twice daily according to the body weight as follows: 5–14 kg, one tablet per dose; 15–24 kg, two tablets per dose; 25–34 kg, three tablets per dose and adult, four tablets

per dose. Patients (adults) or their parents/guardians (children) were advised of the time and mode of administration for the 3 days treatment taken at home unobserved. Patients and or their parents/guardians were advised to administer AL with fat containing food and were asked to come back (with their child) for scheduled visits on days 3, 7, 14, 21, and 28, or if the participant was sick between visits (unscheduled visit). At each visit a physical examination was performed. Blood sample was taken from the finger to prepare thick/thin film, photometric measurement of haemoglobin (HemoCue® 301⁺) and spotted onto filter paper (Whatman 3MM, Maidstone, UK) for later molecular analysis. For identification and reporting of AEs, patients were assessed at each visit according to a standardized checklist and the information was recorded on the case record form (CRF). A severity grading scale, based on the toxicity grading scales developed by the WHO was used to grade severity of all reported adverse events (AEs) and clinical examination findings. All AEs were catalogued based on their frequency, severity, and relationship with AL and ASAQ treatment [9].

Microscopic examination

Blood smears were read in the field at each health facility by light microscopy after they have been stained with 3 % Giemsa for 30 min. Parasite density was determined by counting the number of asexual parasites per 200 white blood cells, and calculated per micro liter of blood by assuming the white blood cells at 8000/ μ L. A smear was declared negative when the examination of 100 thick-film fields did not reveal the presence of asexual parasites. Blood smears were examined by two readers and, in the case of discordant results, by a third reader. Discordant results were defined as a difference between the two readers in (a) *Plasmodium* species, (b) positive and negative, (c) with parasite $>400/\mu$ L; if the higher count divided by the lower count was >2 , (d) with parasite $\leq 400/\mu$ L; if the higher reading is $>\text{Log}_{10}$ higher than the lower reading.

Parasite genotyping

Molecular analysis was performed at the Molecular Biology laboratory of Centre Muraz of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Dried blood spots from day 0 (pre-treatment) and from day of recurrent parasitaemia (post-treatment) during the 28 days follow-up were used for parasite genotyping. *Plasmodium falciparum* DNA was extracted from dried blood spots using QIamp DNA miniKit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's procedures and 80 μ L of DNA template was obtained. DNA was either used immediately for a

polymerase chain reaction (PCR) or stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later analysis. A Nested PCR was used to analyse polymorphism in the merozoite surface protein *msp-1* and *msp-2* genes to distinguish between recrudescence and new infection [10].

Sample size and data analysis

Sample size was calculated by assuming the efficacy of each study treatment to be at least 90 %. Under this assumption a sample of 155 patients per arm will be able to show at the 5 % significance level with 90 % power, that the difference in efficacy between treatments is not more than 10 %. Allowing for a loss to follow-up around 10 %, the final sample size per arm was 170 patients/year and then, 340 patients per arm for the 2 years. Data were double entered by two independent data clerks and a verification program was used to correct errors by referring to the original CRF. The primary treatment outcomes were adequate clinical and parasitological response (ACPR), early treatment failure (ETF), late clinical failure (LCF) and late parasitological failure (LPF). Total treatment failure (TTF) was determined as the sum of ETF, LCF and LPF [11]. Patients classified as treatment failures were given quinine (10 mg/kg orally three times a day for 7 days) and in case of severe malaria or danger signs parenteral quinine was administered. Treatment secondary outcome measures were the tolerability of the treatment that was assessed by the risk of occurrence of adverse events (AEs).

Statistical analysis was performed using STATA (IC), version 10.0 software. Differences between groups were assessed using the Chi square test for proportions and analysis of variances (ANOVA) for continuous normal distributed variables or the non-parametric Kruskal–Wallis to compare continuous not normally distributed variables. Kaplan–Meier product limit formula was used to estimate the risks of treatment failure and of new infections. A p-value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

Ethics

This was part of a larger study entitled 'Pharmacovigilance for artemisinin-based combination treatments in Africa' (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01232530). The study was conducted in accordance with the principle of good clinical practices (GCP). Before enrolment, each participant or parents/guardians signed informed consent form. In case of illiteracy, thumb-printed consent was obtained in the presence of unbiased witness. The study was reviewed and approved by Center Muraz Institutional Ethics Committee, Burkina Faso National Ethics Committee and the World Health Organization (WHO) Ethical Review Committee.

Results

A total of 1480 patients was screened to be included in the study. Among them, 1010 (68.2 %) patients were positive for malaria. Out of them, 680 patients were randomized to receive one of the two treatments. A total of 340 patients received ASAQ as treatment and 340 patients received AL. Twenty (20) patients (2.9 %) were excluded from the analysis and the reasons for exclusion and sampling plan are shown in trial profile (Fig. 1). A total of 496 (75.1 %) patients were children under 5 years old versus 164 (24.8 %) over 5 years of age. The baseline characteristics of patients included in the study are shown in Table 1. At recruitment, the two treatment groups were comparable in all characteristics except for the haemoglobin level, which was higher in AL group than in ASAQ group ($p = 0.019$).

By day 28 the ACPR was significantly higher in ASAQ group than in AL group before and after adjustment by PCR (Table 2). Before PCR adjustment ACPR in AL group was 47.7 versus 67.0 % in ASAQ group [risk difference = -0.19 , 95 % CI (-26.62 ; -11.81), $p < 0.00001$]. The adjusted ACPR was 77.8 % in AL group versus 84.1 % in ASAQ group [risk difference = -6.32 , 95 % CI (-12.29 ; -0.34), $p = 0.0389$]. Two ETF were found in AL group versus three in ASAQ treated patients.

In both AL and ASAQ groups, treatment outcomes were better in patients over 5 years old than in children under five before adjustment by PCR. Before adjustment, ACPR in AL group was 43.3 and 61.7 % in children under 5 years and patients over 5 years old respectively ($p = 0.004$). In ASAQ group ACPR before adjustment was 63.1 % in children under 5 years old versus 78.3 % in patients over 5 years of age ($p = 0.013$). After PCR adjustment, ACPR was higher in older patients than in children less than 5 years old in both treatment groups but the difference was not statistically significant (Table 3).

The risk of recrudescence in both AL and ASAQ group is represented in Fig. 2. The risk of recrudescence was higher in AL treated patients than in those receiving ASAQ ($p = 0.0059$). In both groups the risk of recrudescence became more observable after day 14.

Figure 3 represents the risk of new infection in each of the two treatment arms. The new infections start after day 14 and it was significantly higher in AL group than in ASAQ group.

Both AL and ASAQ treatment were well tolerated by the patients. An average of two AEs per patient was recorded in both AL and ASAQ treated patients. The most commonly observed AEs reported for each AL/ASAQ treatment

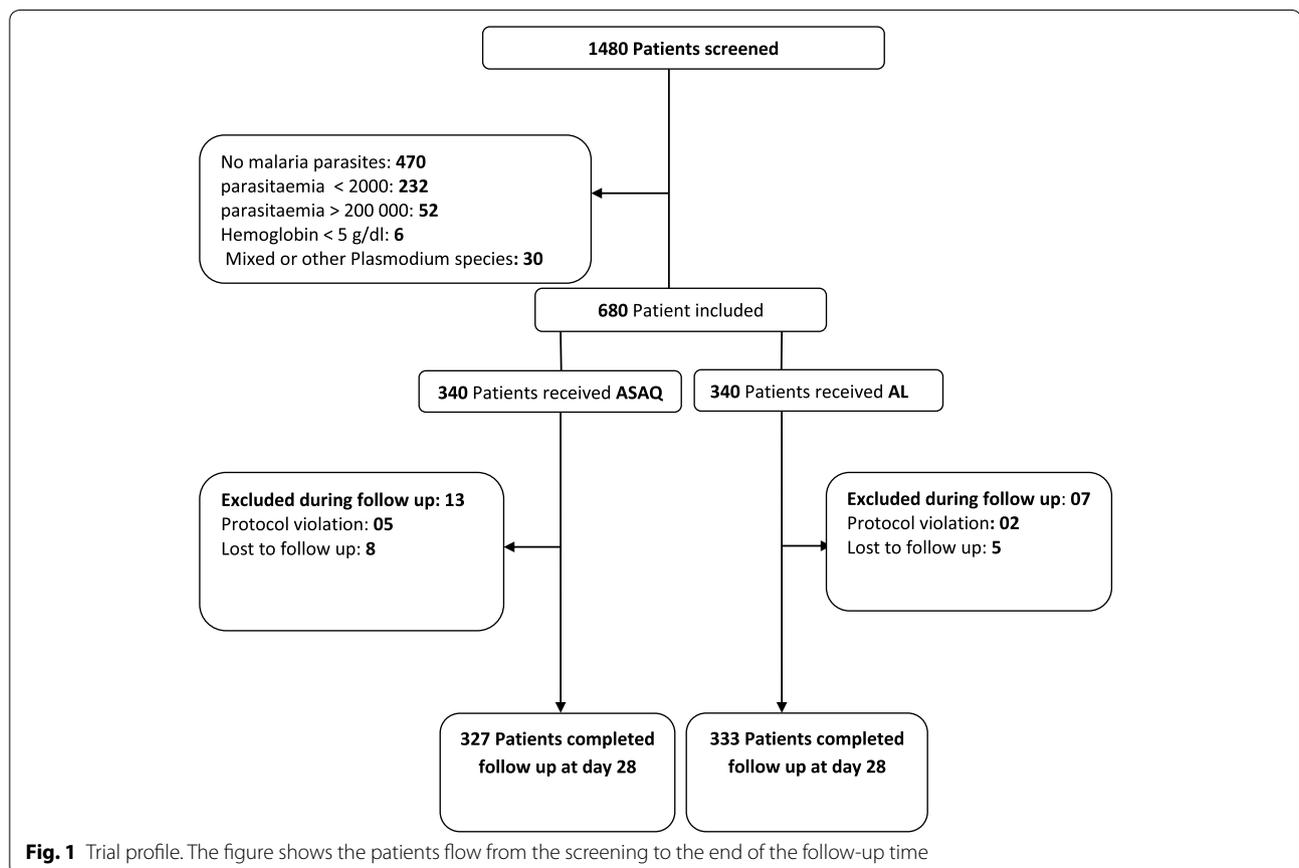


Table 1 Baseline characteristics of included patients

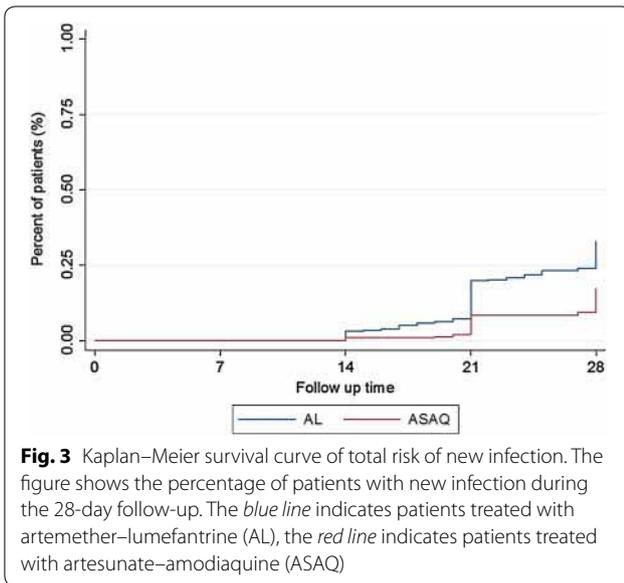
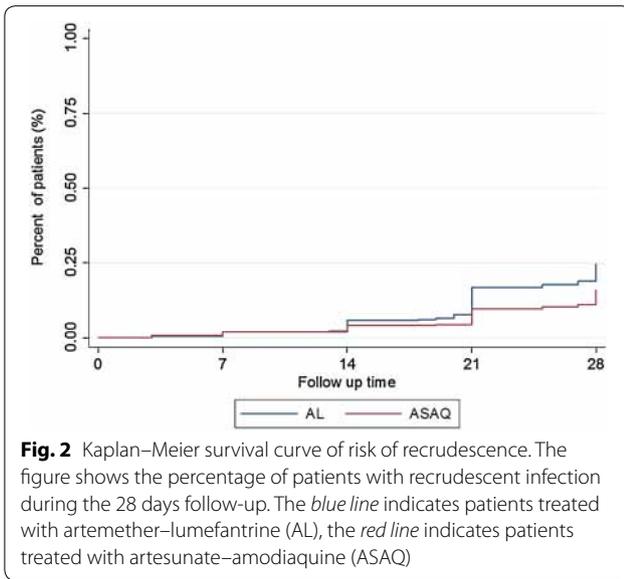
Characteristics	AL, n = 340 (%)	ASAQ, n = 340 (%)	P-value
Site			
Nanoro, n (%)	176 (51.76)	176 (51.76)	–
Nazoanga, n (%)	164 (48.24)	164 (48.24)	
Sex			
Male, n (%)	183 (53.82)	182 (53.53)	0.939
Female, n (%)	157 (46.18)	158 (46.47)	
Age in years, median (p25–p75)	3.26 (1.70–4.98)	3.14 (1.61–5.05)	0.387
Weight in kg, median (p25–p75)	11 (9–14)	10 (9–14)	0.157
Mean temperature (SD)	38.41 (0.91)	38.47 (0.91)	0.381
Hemoglobin in g/dl, median (p25–p75)	9 (8–11)	9 (8–10)	0.019
GMPD (95 % CI)	30,529 (26,809–34,766)	30,763 (27,180–34,818)	0.933

Table 2 Primary treatment outcomes

Treatment outcome	AL, n = 333 (%)	ASAQ, n = 327 (%)	Difference (95 % CI)	P-value
PCR unadjusted				
ACPR	159 (47.8)	219 (67.0)	–0.19 (–26.62; –11.81)	<0.00001
TTF	174 (52.2)	108 (43.0)		
ETF	2 (0.6)	3 (0.9)		
LCF	47 (14.1)	18 (5.5)		
LPF	125 (37.5)	87 (26.6)		
PCR adjusted				
ACPR	259 (77.8)	275 (84.1)	–6.32 (–12.29; –0.34)	0.0389
TTF	74 (22.2)	52 (15.9)		
ETF	2 (0.6)	3 (0.9)		
LCF	22 (6.6)	11 (3.4)		
LPF	50 (15.0)	38 (11.6)		

Table 3 Treatment outcomes by age group

Treatment	Treatment outcome	≤5 years, n = 496 (%)	>5 years, n = 164 (%)	P-value
AL	<i>PCR unadjusted</i>			
	ACPR	109 (43.3)	50 (61.7)	0.004
	TTF	143 (56.7)	31 (38.3)	
	<i>PCR adjusted</i>			
	ACPR	192 (76.2)	67 (82.7)	0.276
	TTF	60 (23.8)	14 (17.3)	
ASAQ	<i>PCR unadjusted</i>			
	ACPR	154 (63.1)	65 (78.3)	0.013
	TTF	90 (36.9)	18 (21.7)	
	<i>PCR adjusted</i>			
	ACPR	199 (81.6)	76 (91.6)	0.053
	TTF	45 (18.4)	7 (8.4)	



were fever (n = 117/83) cough (n = 75/74), diarrhoea (n = 61/65), rhinitis (n = 19/20), anaemia (n = 17/17), vomiting (n = 11/20), abdominal pain (n = 15/11), anorexia (n = 9/12), conjunctivitis (n = 6/10), otitis (n = 9/5), headache (n = 7/7), and pruritus (n = 5/3). Six serious adverse events (SAE) were found in AL group versus four in ASAQ group and most of them were not linked to the treatment. The majority of AE was mild and was unlikely or definitely unrelated to the administered treatment (Table 4).

Discussion

Although numerous studies carried out in malaria endemic countries had shown good efficacy and safety

Table 4 Safety information by treatment arm

Treatment	AL, n = 193	ASAQ, n = 188	P-value
Total number of adverse events (AE)	386	346	–
Mean AEs per patient	2	1.8	0.20
Severity of adverse events (%)			
Mild	83.4	84.7	0.642
Moderate	13.7	13.9	0.956
Serious	2.9	1.4	0.382
Relationship of events with the treatment (%)			
Definitely unrelated	29.5	30.3	0.810
Unlikely	54.2	55.2	0.774
Possible	12.7	10.7	0.401
Probable	3.6	3.8	0.926
Definitely related	0	0	–

of ACT for the treatment of uncomplicated malaria, the conditions of clinical trials do not fully reflect real field situation. Moreover, the assessment of the efficacy of the unsupervised therapy is of greatest interest in a context of home management of malaria by community medicines distributors. This study shows that the unsupervised cure rate after adjustment by day 28 is 77.8 and 84.1 %, respectively for AL and ASAQ, indicating a lowering of the cure rate when drug intake is not directly supervised. Similar findings have been observed in a study carried out on Gabonese children [12]. A recent study conducted in the same area has also shown a cure rate of 89.7 % for AL and 89.8 % for ASAQ after 42 days follow-up for the unsupervised malaria treatment [6]. However when drug administration is directly supervised a cure rate of about 90 % has always been observed [13, 14]. But as in this study drug intakes were not supervised and the assessment adherence was based on patient self-reporting on day 3, this lowering of the cure rate should be taken with caution. This constituted one of the limitations of our study because some studies have shown a difference in adherence rate obtained by the use of different methods and the assessment based on patients self-reporting seems not to be the most appropriate [15, 16]. Therefore, compliance to the treatment and above all, the preferable administration of AL with fatty food that could not be respected in real field conditions could explain the lowering of the cure rate. Thus the unsupervised therapy with AL results in lower plasma levels of lumefantrine with an increased risk for early infection [17]. Furthermore, vomiting was one of the commonest AEs observed in both AL and ASAQ treated patients. In the unsupervised condition it was difficult to obtain reliable information about time elapsed between drug intake and vomiting and this could affect the efficacy of the two drugs when

it occurred a while after drugs intake. Moreover a recent *ex vivo* study conducted at the same area has shown a decrease in sensitivity of lumefantrine in the country and this could further explain this lowering of the cure rate [18]. In addition findings in a study carried out in Kenya indicated a decline in sensitivity of *P. falciparum* to ACT, in particular AL and dihydroartemisinin–piperazine [19]. It is also known that some cases of artemisinin-resistance have been recorded in Asia, and a particular care for the wide spread use at community level should be taken for the preservation of the activity of these drugs [20]. Of particular interest in this study was the involvement of patients of all age groups and this shows that the parasitological cure rate in patients over 5 years is higher than for children under 5 years of age. This is not surprising and could be explained by the additive effect of the partially acquired immunity in aged patients living in endemic area due to frequent expositions to mosquito bites [21].

This study also shows that by day 28, over 50 % of treated patients had recurrent parasitaemia, most of them were re-infected with new *P. falciparum* strains. The risk of being re-infected is higher in AL treated patients than those receiving ASAQ and this starts after day 14 in both two study arms. The phenomenon of recurrent parasitaemia would increase the cost of malaria treatment and control and hence the use of a long half-life medicine would be necessary in such context.

Both AL and ASAQ were well-tolerated, similar to many other studies with AEs mostly mild and not linked to the administrated treatment [5, 22]. A limitation to this study was the challenge of getting reliable safety recall information from young children who constituted an important part of the study population.

Conclusion

In a context where home management of malaria has been adopted as one of the main strategies for malaria control, the assessment of the effectiveness of unsupervised therapy is of fundamental importance. This study shows a lowering of the efficacy when drug intake is not directly supervised. The results reported here is worrying as both rates are lower than the critical threshold of 90 % required by the WHO to recommend the use of an antimalarial drug in a treatment policy [23, 24]. Nevertheless, there is a need to conduct similar studies coupled with a collection of data on study participants' adherence to treatment and diet habit to confirm these findings.

Abbreviations

ACT: artemisinin combination therapy; AL: artemether–lumefantrine; ASAQ: artesunate–amodiaquine; *msp-1*: merozoite surface protein-1 gene; *msp-2*: merozoite surface protein-2 gene; PCR: polymerase chain reaction; ACPR:

adequate clinical and parasitological response; ETF: early treatment failure; LCF: late clinical failure; LPF: late parasitological failure; TTF: total treatment failure; SAE: serious adverse event; DNA: de-oxy-ribonucleic-acid; GMPD: geometric mean parasite density; AE: adverse event; CRF: case record form.

Authors' contributions

TH, SP, JBO, IV, TRG, DK, ZT, HS designed the study, TH, SP, DK, ZT, SDN, HS contributed for data collection and supervision in the field, SP, OZ carried out the laboratory analyses, AK carried out the data management and statistical analysis, SP, TH, ODE drafted the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ IRSS, Clinical Research Unit of Nanoro (CRUN), CMA Saint Camille of Nanoro, BP 218 Ouagadougou CMS 11, Nanoro, Burkina Faso. ² Centre Muraz of Bobo-Dioulasso, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ³ Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana.

Acknowledgements

We thank the study participants and the staff of the Nanoro Health District for their support. We are grateful to sanofi aventis and WHO-TDR for the financial support of the study. We are also grateful to the Institute of Tropical Medicine, Belgium (FA3-DGCD programme) for the financial support of the laboratory work. Special thanks to Prof Umberto d'Alessandro and Dr Ambrose Talisuna for their contribution to the pharmacovigilance study protocol finalization.

Compliance with ethical guidelines

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Received: 6 May 2015 Accepted: 10 August 2015

Published online: 20 August 2015

References

- WHO. Antimalarial drug combination therapy: report of a technical consultation. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Ministry of Health of Burkina Faso/PNLP. Directives Nationales pour la prise en charge du paludisme au Burkina Faso; 2006.
- Kobbe R, Klein P, Adjei S, Amemasor S, Thompson WN, Heidemann H, et al. A randomized trial on effectiveness of artemether–lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malar J*. 2008;7:261.
- Bassat Q, Mulenga M, Tinto H, Piola P, Borrmann S, Menéndez C, et al. Dihydroartemisinin–piperazine and artemether–lumefantrine for treating uncomplicated malaria in African children: a randomised, non-inferiority trial. *PLoS One*. 2009;4:e7871.
- Meremikwu M, Alaribe A, Ejemot R, Oyo-Ita A, Ekenjoku J, Nwachukwu C, et al. Artemether–lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for treating uncomplicated childhood malaria in Nigeria: randomized controlled trial. *Malar J*. 2006;5:43.
- Tinto H, Diallo S, Zongo I, Guiraud I, Valea I, Kazienga A, et al. Effectiveness of artesunate–amodiaquine vs. artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: a noninferiority randomised trial. *Trop Med Int Health*. 2014;19:469–75.
- Ministry of Health of Burkina Faso/DSN. Acting plan 2014 of the Nanoro Sanitary District; 2013.
- Derra K, Rouamba E, Kazienga A, Ouedraogo S, Tahita MC, Sorgho H, et al. Profile: Nanoro health and demographic surveillance system. *Int J Epidemiol*. 2012;41:1293–301.
- WHO. Toxicity grading scale for determining the severity of adverse events. World Health Organization; 2003.
- Ranford-Cartwright L, Taylor J, Umasunthar T, Taylor L, Babiker H, Lell B, et al. Molecular analysis of recrudescence parasites in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:719–24.

11. WHO. Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization; 2003.
12. Oyakhirome S, Pötschke M, Schwarz NG, Dörnemann J, Laengin M, Salazar CO, et al. Artesunate–amodiaquine combination therapy for falciparum malaria in young Gabonese children. *Malar J*. 2007;6:29.
13. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Dokomajilar C, Séré Y, Rosenthal PJ, et al. 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*. 2007;45:1453–61.
14. Ndiaye JL, Randrianarivojosia M, Sagara I, Brasseur P, Ndiaye I, Faye B, et al. Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ—a fixed-dose artesunate–amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2009;8:125.
15. Adams A, Soumerai SB, Lomas J, Ross-Degnan D. Evidence of self-report bias in assessing adherence to guidelines. *Int J Qual Health Care*. 1999;11:187–92.
16. Bell DJ, Wootton D, Mukaka M, Montgomery J, Kayange N, Chimpeni P, et al. Measurement of adherence, drug concentrations and the effectiveness of artemether–lumefantrine, chlorproguanil–dapsone or sulphadoxine–pyrimethamine in the treatment of uncomplicated malaria in Malawi. *Malar J*. 2009;8:204.
17. White NJ, van Vugt M, Ezzet FD. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether–lumefantrine. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37:105–25.
18. Tinto H, Bonkian LN, Nana LA, Yerbanga I, Lingani M, Kazienga A, et al. Ex vivo anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malar J*. 2014;13:207.
19. Borrmann S, Sasi P, Mwai L, Bashraheil M, Abdallah A, Muriithi S, et al. Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PLoS One*. 2011;6:e26005.
20. Phyto AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*. 2012;379:1960–6.
21. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:452–9.
22. Brasseur P, Vaillant MT, Olliaro PL. Anti-malarial drug safety information obtained through routine monitoring in a rural district of South-Western Senegal. *Malar J*. 2012;11:402.
23. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2010.
24. WHO. Global report on antimalaria drug efficacy and drug resistance: 2000–2010. Geneva: World Health Organization; 2000.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Therapies and Selection of *Pfcr* and *Pfmdr1* Alleles in Nanoro, Burkina Faso

Paul Sondo^{1*}, Karim Derra¹, Seydou Diallo Nakanabo^{1,2}, Zekiba Tarnagda¹, Adama Kazienga¹, Odile Zampa², Innocent Valéa^{1,2}, Hermann Sorgho¹, Ellis Owusu-Dabo³, Jean-Bosco Ouédraogo¹, Tinga Robert Guiguemdé², Halidou Tinto^{1,2}

1 IRSS / Clinical Research Unit of Nanoro (CRUN), Nanoro, Burkina Faso, **2** Centre Muraz of Bobo-Dioulasso, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **3** Kumasi Center for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana

* paulsondo@yahoo.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Sondo P, Derra K, Diallo Nakanabo S, Tarnagda Z, Kazienga A, Zampa O, et al. (2016) Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Therapies and Selection of *Pfcr* and *Pfmdr1* Alleles in Nanoro, Burkina Faso. PLoS ONE 11(3): e0151565. doi:10.1371/journal.pone.0151565

Editor: Charles Jonathan Woodrow, Mahidol Oxford Tropical Medicine Research Unit, THAILAND

Received: October 24, 2015

Accepted: March 1, 2016

Published: March 31, 2016

Copyright: © 2016 Sondo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: Sanofi Aventis and WHO-TDR (World Health Organisation Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) provided financial support for study samples collection. The Institute of Tropical Medicine, Belgium (FA3 – DGCD program) provided financial support for laboratory work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The adoption of Artemisinin based combination therapies (ACT) constitutes a basic strategy for malaria control in sub-Saharan Africa. Moreover, since cases of ACT resistance have been reported in South-East Asia, the need to understand *P. falciparum* resistance mechanism to ACT has become a global research goal. The selective pressure of ACT and the possibility that some specific *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles are associated with treatment failures was assessed in a clinical trial comparing ASAQ to AL in Nanoro. Dried blood spots collected on Day 0 and on the day of recurrent parasitaemia during the 28-day follow-up were analyzed using the restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) method to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *Pfcr* (codon76) and *Pfmdr1* (codons 86, 184, 1034, 1042, and 1246) genes. Multivariate analysis of the relationship between the presence of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles and treatment outcome was performed. AL and ASAQ exerted opposite trends in selecting *Pfcr* K76T and *Pfmdr1*-N86Y alleles, raising the potential beneficial effect of using diverse ACT at the same time as first line treatments to reduce the selective pressure by each treatment regimen. No clear association between the presence of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles carried at baseline and treatment failure was observed.

Introduction

Plasmodium falciparum resistance to antimalarial drugs is the main challenge for malaria control in endemic countries. To overcome resistance to chloroquine (CQ), artemisinin-based combination therapies (ACT) have been recommended by the World Health Organization (WHO) for the treatment of uncomplicated malaria [1]. To date, ACT has been adopted in up to 84 countries as first line treatment for uncomplicated malaria. In Burkina Faso, Artesunate-

Amodiaquine (ASAQ) and Artemether–Lumefantrine (AL) are now the two first line malaria regimens in replacement of CQ (when CQ resistance reached its critical level in the country) [2] and a good efficacy and safety of these drugs is hitherto recorded [3, 4]. However recently, parasite resistance to artemisinin has been reported in five South-East Asian countries: in Cambodia, the Lao People's Democratic Republic, Myanmar, Thailand and Viet Nam [5–7]. Moreover a decrease of ACT sensitivity has also been recorded in diverse studies including those carried out in sub-Saharan Africa [8, 9]. Due to a lack of an alternative antimalarial medicine with the same level of efficacy and tolerability as ACT at present, some effort should be deployed to determine at an early stage tools that can be used to monitor the rise and spread of artemisinin resistance in sub-Saharan Africa. For this reason, the need for a valid molecular markers associated with *P. falciparum* resistance to ACT is a major concern since it could allow for a more precise mapping and monitoring of the spread of resistance. The Kelch-13 marker has been associated with artemisinin resistance *in vivo and vitro* although its assessment is quite laborious for most of the sub-Saharan Africa countries [10]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *P. falciparum* CQ resistance transporter gene (*Pfcr1*) and *P. falciparum* multi-drug resistance gene 1 (*Pfmdr1*) have been known to be associated with aminoquinoline resistance [11]. We explored the possible involvement of those markers in *P. falciparum* treatment failures to ACT [12, 13]. In addition, resistance could occur as a consequence of a selective pressure of an antimalarial regimen leading to a disappearance of sensitive strains and a proliferation of resistant strains. Therefore the selective impact of ACT needs to be closely monitored following their ongoing large scale deployment at community level. However since their adoption in Burkina Faso, few data on the selective impact of ACT in the circulating parasite population is available. It is in the light of all these aspects that this study was carried out with the aim of assessing the selective impact of the treatment with ASAQ and AL for *Pfcr1* and *Pfmdr1* alleles and to correlate the presence of those alleles with *in vivo* treatment failures in Nanoro, Burkina Faso.

Material and Methods

Study area

The study was carried out at two peripheral health facilities (Nanoro and Nazoanga) of the Nanoro Health District (NHD) situated in the central part of Burkina Faso. Nanoro is located in the Sudanese savannah zone with two distinct seasons: a rainy season occurring from June /July to October/November followed by a long dry season from November to May. Malaria transmission is highest in the rainy season with a peak located around October-November. *P. falciparum* is the most prevalent species. Recent entomological data reported in the country indicates that *An. gambiae s.s.* and *An. arabiensis* are the main vectors for malaria transmission [14]. NHD encompasses an area of 1302 km² with an approximate population of 158.127 inhabitants in 2014 [15]. Population is composed of three major ethnic groups: Mossi, Gourounssi and Fulani and the majority of the population practice subsistence farming [16].

Source of samples and study design

Samples analyzed in this study have been collected from a pharmacovigilance study whose one component aimed at assessing the effectiveness of ASAQ versus AL with a molecular analysis of resistance markers nested to it. Details of the study methodology have been described elsewhere (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01232530). Briefly, patients suffering of uncomplicated falciparum malaria were recruited and randomly assigned to receive either AL or ASAQ and were followed up for 28 days with scheduled visits on day 3, 7, 14, 21, and 28. At each visit, blood samples were collected for microscopic examination, haemoglobin measurement and

spotted onto filter paper (Whatman 3MM, Maidstone, UK) for later PCR analyses. Details of the effectiveness trial results have been reported elsewhere [17]. For the current analysis; all dried blood spots from day 0 (before treatment) and at the day of recurrent parasitaemia (recrudescence + new infection) during the follow-up were genotyped to detect SNPs in *Pfmdr1* and *Pfcr1* (codon76) genes.

DNA isolation

DNA isolation was performed at the molecular Biology laboratory of Centre Muraz located at Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *P. falciparum* DNA was extracted from dried blood spots using QIamp DNA miniKit (Qiagen, Germany) following the manufacturers procedures and 80µL of DNA template was obtained. DNA was either used immediately for a polymerase chain reaction (PCR) or stored at -20°C for later PCR analyses.

Distinction between recrudescence and new infection

Nested PCR approach was used to assess polymorphism in two polymorphic loci (merozoite surface proteins *msp1* and *msp2*) in order to distinguish between recrudescence and new infections as previously described elsewhere [18]. Briefly, DNA fragments obtained from amplification of baseline sample (day 0) and on the day of recurrent parasitaemia were compared according to band size and number, considering the 3 families of *msp1* (Mad20, RO33, K1) and the 2 families of *msp2* (3D7, FC27). Cases were categorized as recrudescence when there was at least one common band between baseline sample and that of the day of parasite reappearance for either the 2 markers (even if there were additional bands on day 0). However, when there were no common bands between day 0 and the day of recurrent parasitaemia, patient was categorized as new infection. Cases were considered not to be clinical failures if their recurrent parasitaemia was classified as new infection rather than recrudescence infection.

Detection of SNPs in *Pfcr1* and *Pfmdr1* genes

Detection of SNPs in *Pfcr1* and *Pfmdr1* genes was performed using nested PCR method followed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described by Dorsey et al [19]. Briefly, an initial amplification of the outer region of each gene was followed by nested PCR using specific primers. For *Pfcr1* the restriction enzyme *Apo I* was used for the digestion of PCR products. For *Pfmdr1* the following restriction enzymes were used: *Afl III* (NEB), *Dra I* (NEB), *Dde I* (NEB), *Ase I* (NEB), and *Eco R V* (NEB) respectively for *Pfmdr1*-N86Y, *Pfmdr1*-Y184F, *Pfmdr1*-S1034C, *Pfmdr1*- N1042D and, *Pfmdr1*-D1246Y. After digestion, DNA bands were visualized in ethidium bromide-stained 2.5% agarose gels for 2 hours at 80 V. 3D7 were used as wild type control for both *Pfcr1* (codon 76) and *Pfmdr1* and the following mutant controls were used: *Dd2* (*Pfmdr1*-N86Y), *7G8* (*Pfmdr1* Y184F/S1034C/N1042D/D1246Y, *Pfcr1*-K76T).

Statistical analysis

Clinical Data were double entered in an ACCESS database by two independent data clerks. Molecular data were entered independently from treatment outcomes in an Excel database. Statistical analysis was performed using STATA (IC), version 10.0 software. *Pfcr1* and *Pfmdr1* genotype profile was determined by the presence or absence of wild/mutant alleles. Samples carrying both wild and mutant *Pfcr1* or *Pfmdr1* alleles and for which related frequencies could not be determined were excluded from the analysis. Differences between groups were assessed using the Chi-square test for proportions and a P-value of less than 0.05 was considered as

statistically significant. A logistic regression was used to detect mutations that were predictive of AL and ASAQ treatment failure.

Ethical consideration

This was part of a larger study entitled “Pharmacovigilance for artemisinin-based combination treatments in Africa (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01232530). A signed informed consent was obtained from each participant before enrolment. The study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of Muraz center, the National Ethics Committee of Burkina Faso, and the Ethical Review Committee of the World Health Organization (WHO).

Results

Clinical and parasitological responses

The clinical and parasitological responses of both AL and ASAQ treatment have been reported elsewhere [17]. Briefly, a total of 680 patients with uncomplicated malaria were randomized to receive either ASAQ (n = 340) or AL (n = 340). PCR uncorrected parasitological failure rate of 52.2% and 43.0% were reported for AL and ASAQ treatment groups respectively. By 28 days follow-up, *msp1* and *msp2* genotyping analysis showed that recrudescence infections concerned 121 patients (n = 74 in AL group and n = 52 in ASAQ group), 156 patients were infected by new *P. falciparum* strains (n = 100 in AL group and n = 56 in ASAQ group).

Baseline Prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr1* alleles by treatment group

Prior to treatment (Day 0), SNPs in *Pfcr*t-K76T and *Pfmdr1* (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y) genes were systematically determined in all samples whose treatment outcomes were available (n = 660), stratified by treatment group. Fig 1 shows the trial profile indicating the number of isolates analyzed by treatment group and the number of successful PCR-RFLP amplification (Fig 1). At baseline, prevalence of *Pfcr*t-K76T mutation was almost similar in both AL and ASAQ treatment group (21.80% versus 20.21% respectively). Prevalence of *Pfmdr1*-N86Y mutation was also similar in the two treatment groups (8.31% for AL versus 8.25% for ASAQ). Considering *Pfmdr1*-Y184F, its prevalence was higher in ASAQ group than in AL group but the difference was not statistically significant (53.26% versus 49.82%). Extremely few cases of mutation in *Pfmdr1*-D1246Y were found (n = 3). No sample showed mutation at *Pfmdr1*-S1034C and *Pfmdr1*-N1042D loci in both AL and ASAQ treatment groups.

Impact of AL and ASAQ treatment in selecting *Pfcr*t and *Pfmdr1* alleles

The selective impact of AL and ASAQ treatment for particular *Pfcr*t and *Pfmdr1* alleles was assessed by comparing on one side prevalence between baseline and in recrudescence infections group and on the other side between baseline and in patient with newly acquired infections within 28 days after treatment. Table 1 shows the prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr1* alleles before and after AL treatment.

The wild *Pfcr*t-K76 allele increased significantly after treatment with AL in both recrudescence ($p < 0.00001$) and new infection groups ($p = 0.0487$) while a decrease of the mutant *Pfcr*t T76 allele was observed. There was an increase of the wild N86 allele after treatment with AL in the two groups (recrudescence and new infection) but the difference was not statistically significant. Table 2 shows the prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr1* alleles before and after ASAQ treatment.

Unlike AL, the mutant *Pfcr*t 76T allele increased significantly after treatment with ASAQ in both recrudescence ($p = 0.0025$) and new infection ($p < 0.00001$) groups while a decrease of the wild *Pfcr*t K76 was observed. After treatment with ASAQ there was also an increase of the mutant

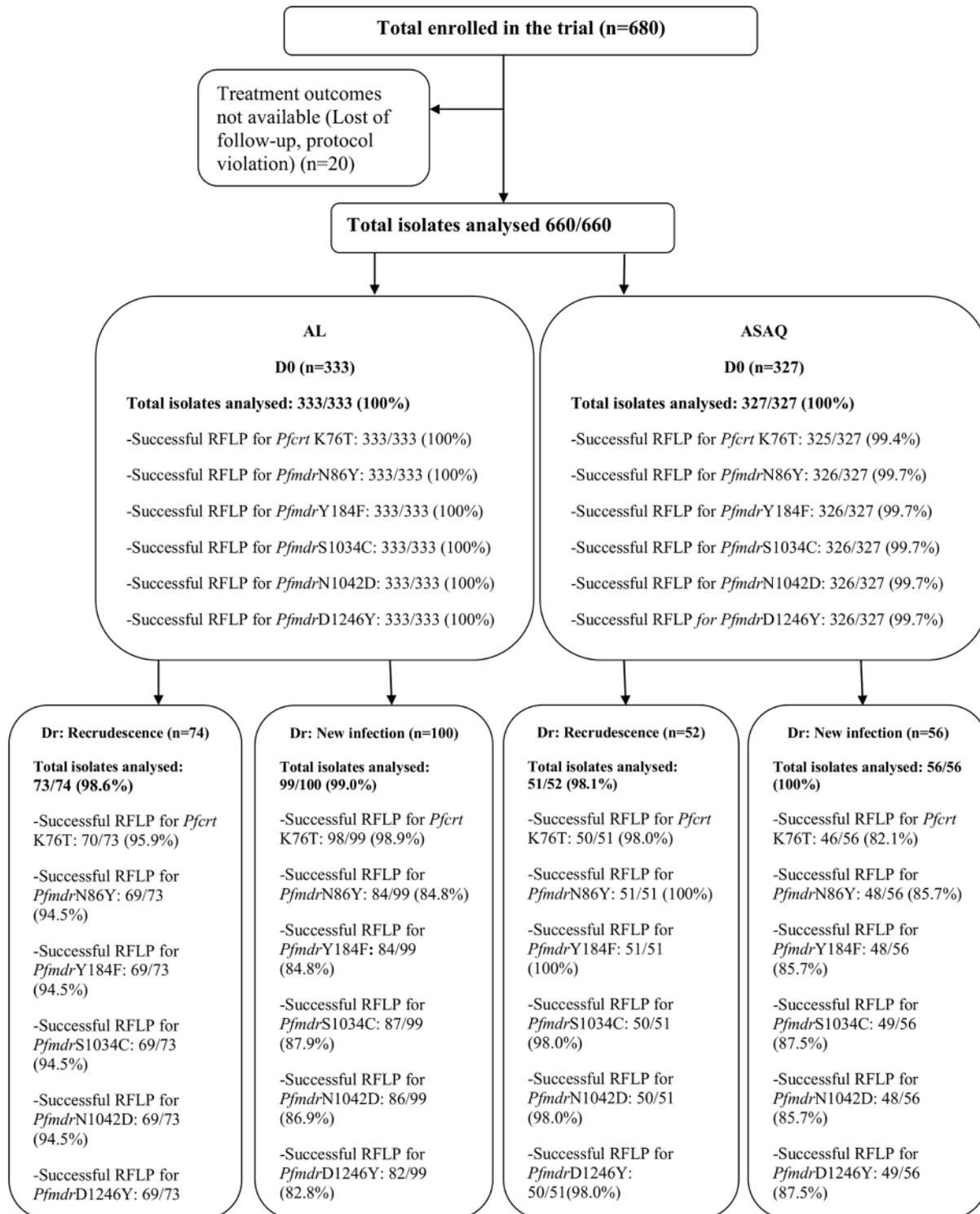


Fig 1. Trial profile. The figure shows the number of isolates analyzed at day 0 and on the Day of recurrent parasitaemia (recrudescence and new infections) by treatment group (AL and ASAQ) and the number of successful PCR-RFLP amplification.

doi:10.1371/journal.pone.0151565.g001

Table 1. Prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles before and after treatment with AL % (n/N).

Gene	Genotype profile	Pre-Treatment	Recrudescence	P-value	New infection	P-value
<i>Pfcr</i> t	K76	78.20 (226/289)	93.33 (56/60)	<0.00001	87.95 (73/83)	0.0487
	76T	21.80 (63/289)	6.67 (4/60)		12.05 (10/83)	
<i>Pfmdr</i> 1	N86	91.69 (276/301)	95.65 (66/69)	0.2621	95.18 (79/83)	0.2868
	86Y	8.31 (25/301)	4.35 (3/69)		4.82 (4/83)	
<i>Pfmdr</i> 1	Y184	50.18 (140/279)	55.74 (34/61)	0.4313	41.25 (33/80)	0.1588
	184F	49.82 (139/279)	44.26 (27/61)		58.75 (47/80)	

doi:10.1371/journal.pone.0151565.t001

86Y and the difference was statistically significant in the new infection group ($p = 0.0004$). No evidence of selection of *Pfmdr*1-Y184F alleles after treatment with ASAQ was observed.

Relationship between SNPs in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes with treatment outcomes

Multivariate analysis of the relationship between the presence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles and treatment outcome was performed. The effect of age on this association was evaluated after stratification of the patients into two groups (<5 years and ≥ 5 years) regarding the significant importance of this distinction in malaria epidemiology. Haemoglobin (Hb) level and parasite density (PD) were also stratified into two groups (<Hb/PD median and \geq Hb/PD median). [Table 3](#) shows results of the multivariate analysis of the association between the presence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles and AL treatment failures.

A significant association with AL treatment failure was found, with the presence on day 0 of *Pfmdr*1-Y184 allele but not with others *Pfmdr*1 and *Pfcr*t alleles.

[Table 4](#) shows results of the multivariate analysis of the association between the presence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles and ASAQ treatment failures.

No association was observed between the presence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles carried at baseline and ASAQ treatment failure before and after adjustment according to multivariate analysis.

Discussion

The understanding of *P. falciparum* resistance mechanisms to ACT is now a major concern since a decrease of their sensitivity and some cases of resistance have been reported in some part of the world. In this study we report on the selective pressure of the two recommended treatments for uncomplicated malaria in Burkina Faso and on the correlation between SNPs in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes and *in vivo* treatment failure.

We found a similar baseline prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles between the two treatment groups. This similarity of baseline prevalence in the two arms may indicate that any significant change of prevalence in post-treatment was drug dependent. Furthermore, except for

Table 2. Prevalence of *Pfcr*t and *Pfmdr*1 alleles before and after treatment with ASAQ % (n/N).

Gene	Genotype profile	Pre-Treatment	Recrudescence	P-value	New infection	P-value
<i>Pfcr</i> t	K76	79.79 (225/282)	57.89 (22/38)	0.0025	34.21 (13/38)	<0.00001
	76T	20.21 (57/282)	42.11 (16/38)		65.79 (25/38)	
<i>Pfmdr</i> 1	N86	91.75 (267/291)	89.36 (42/47)	0.5873	73.81 (31/42)	0.0004
	86Y	8.25 (24/291)	10.64 (5/47)		26.19 (11/42)	
<i>Pfmdr</i> 1	Y184	46.74 (136/291)	39.13 (18/46)	0.3356	40.43 (19/47)	0.4205
	184F	53.26 (155/291)	60.87(28/46)		59.57 (28/47)	

doi:10.1371/journal.pone.0151565.t002

Table 3. Multivariate analysis of the association between SNPs in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes and AL treatment failure.

	Crude OR	95%CI	P-value	Adjusted OR	95%CI	P-value
Age group						
< 5 years	1.43	0.74–2.73	0.277			
≥ 5 years	1.00	-	-			
Haemoglobin level						
<median = 9 g/dl	1.25	0.73–2.16	0.404			
≥ median = 9 g/dl	1.00	-	-			
Parasite density						
< G median = 30529 /μl	1.00	-	-			
≥ G median = 30529 /μl	1.16	0.68–1.98	0.566			
<i>Pfcr</i>t K76T						
Wild	1.70	0.78–3.69	0.176	1.15	0.47–2.81	0.751
Mutant	1.00	-	-	1.00	-	-
<i>Pfmdr</i>1 N86Y						
Wild	1.00	-	-	1.00	-	-
Mutant	1.16	0.44–3.03	0.760	2.59	0.82–8.08	0.101
<i>Pfmdr</i>1-Y184F						
Wild	1.00	-	-	1.00	-	-
Mutant	0.46	0.25–0.85	0.014	0.37	0.16–0.83	0.017

doi:10.1371/journal.pone.0151565.t003

mutation *Pfmdr*1-Y184F, a lower baseline prevalence of mutation in the two genes was found. Indeed, Burkina Faso was a setting of high CQ resistance (with extremely high prevalence of those mutations) [2] and this lowering of prevalence is attributable to the change of treatment policy from CQ to ACT since 2005 [20]. The high prevalence of *Pfmdr*1-Y184F mutation in the country was previously recorded [21].

Table 4. Multivariate analysis of the association between SNPs in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes and ASAQ treatment failure.

	Crude OR	95%CI	P-value	Adjusted OR	95%CI	P-value
Age group						
< 5 years	2.25	0.97–5.24	0.058			
≥ 5 years	1.00	-	-			
Haemoglobin level						
<median = 9 g/dl	1.00	-	-			-
≥ median = 9g/dl	0.46	0.25–0.86	0.016			
Parasite density						
< median = 30762 /μl	1.00	-	-			-
≥ median = 30762 /μl	1.46	0.78–2.73	0.225			
<i>Pfcr</i>t K76T						
Wild	1.00	-	-	1.00	-	-
Mutant	1.20	0.55–2.61	0.633	1.68	0.67–4.21	0.263
<i>Pfmdr</i>1 N86Y						
Wild	1.00	-	-	1.00	-	-
Mutant	0.86	0.24–3.02	0.815	0.78	0.20–3.01	0.729
<i>Pfmdr</i>1-Y184F						
Wild	1.00	-	-	1.00	-	-
Mutant	0.95	0.49–1.84	0.901	0.96	0.43–2.14	0.932

doi:10.1371/journal.pone.0151565.t004

Our findings show positive selection of the Wild *Pfcr*-K76 and *Pfmdr1*-N86 alleles after treatment with AL which corroborates previous reports in several settings [22–25]. Interestingly, this does not affect the efficacy of this treatment regimen because the selecting strains were not associated with treatment failure. However, in a recent study carried out by Venkatesan et al *Pfmdr1*-N86 allele was identified as an independent risk factor for recrudescence in patient treated with AL meaning that this selective pressure needs to be closely monitored [26].

We also found a positive selection of the mutant *Pfcr*-76T and *Pfmdr1*-86Y alleles after treatment with ASAQ. We postulate that this positive selection of mutant type by ASAQ is due to the presence of AQ (structurally similar to CQ) as partner drug in this combination [27, 28]. In this regard, though the selected alleles were not associated with treatment failure in the present study, ASAQ efficacy could be affected in the future (when the selected resistant strains will be predominant in the area) by decreasing sensitivity to AQ in an area of high CQ resistance (few years before) such as Burkina Faso. This means that in such context, AL might be more appropriate in setting of high CQ resistance (with high prevalence of mutant allele) than ASAQ.

The observations stated above show obviously that AL and ASAQ exerted opposite trend in term of selecting parasite strains. In Burkina Faso, the two drugs have been adopted at the same time as first line treatments of uncomplicated malaria. Thus, these findings raise the beneficial effect of using this strategy in term of avoiding the selection of resistant circulating *P. falciparum* strains by one treatment regimen.

Our findings suggest also no association between the presence of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles carried at baseline and ASAQ treatment failure, consistent with a previous report [26]. The *Pfmdr1*-Y184 allele appeared to be associated with AL treatment failure. However, this mutation was not under significant selection pressure after AL treatment. Moreover, previous work has described an association of the Y184F mutation with decreasing sensitivity to lumefantrine [29]. Therefore, the observation might be simply a chance finding. The relationship between the carriage of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles and AL and ASAQ treatment outcome would have been easier to assess if drug intake was supervised in the effectiveness study. This was mentioned as a limit of our study in the previous report [17]. Furthermore, the use of two markers (*msp1* and *msp2*) instead of three [*msp1*, *msp2*, and *glurp* (*glutamate rich protein*)] to distinguish between recrudescence and new infections constitutes another limit of this study and could partially explain why no significant difference was observed between the two groups (recrudescence and new infections). In this study the prevalence of mutation in *Pfmdr1*-D1246Y was extremely low and it was difficult to correlate the presence of this mutation and treatment outcomes. No samples carried mutation in *Pfmdr1*-S1034C and *Pfmdr1*-N1042D as reported by several studies throughout Africa [21, 30].

Conclusion

AL and ASAQ exerted opposite trends in selecting *Pfcr* K76T and *Pfmdr1*-N86Y alleles, raising the potential beneficial effect of using diverse ACT at the same time as first line treatments to reduce the selecting pressure by each treatment regimen. No association between the presence of *Pfcr* and *Pfmdr1* alleles carried at baseline and ASAQ treatment failure was observed.

Supporting Information

S1 Fig. Trial profile showing the number of samples analysed at day 0 and among recrudescence and new infections by treatment arm.

(XLSX)

Acknowledgments

We would like to express our profound gratitude to study participants, the research team of pharmacovigilance project, and the staff of the Nanoro Health District for their support. We are grateful to Sanofi Aventis and WHO-TDR for the financial support of the field work. The Institute of Tropical Medicine, Belgium (FA3 –DGCD program) deserves a special thank for the financial support of the laboratory work. We are particularly indebted to Prof Umberto d’Alessandro and Dr Ambrose Talisuna for their contribution to the Pharmacovigilance study protocol finalization.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HT PS JBO IV TRG KD ZT HS. Performed the experiments: PS OZ. Analyzed the data: AK. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT PS KD ZT SDN HS. Wrote the paper: EOD PS HT.

References

1. WHO. Antimalarial drug combination therapy: report of a technical consultation. Geneva: 2001.
2. Tinto H, Sanou B, Dujardin J-C, Ouedraogo JB, VAN OVERMEIR C, Erhart A, et al. Usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005; 73(1):171–3. PMID: [16014853](#)
3. Ministry of health of Burkina Faso/PNLP. Nationale guideline for malaria cases management in Burkina Faso. 2006.
4. Tinto H, Diallo S, Zongo I, Guiraud I, Valea I, Kazienga A, et al. Effectiveness of artesunate–amodiaquine vs. artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*. 2014; 19(4):469–75.
5. Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(5):540–1. doi: [10.1056/NEJMc0900231](#) PMID: [19641219](#)
6. Phyto AP, Nkhoma S, Stepniwska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*. 2012; 379(9830):1960–6.
7. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371(5):411–23. doi: [10.1056/NEJMoa1314981](#) PMID: [25075834](#)
8. Borrmann S, Sasi P, Mwai L, Bashraheil M, Abdallah A, Muriithi S, et al. Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PloS one*. 2011; 6(11):e26005. doi: [10.1371/journal.pone.0026005](#) PMID: [22102856](#)
9. Tinto H, Bonkian LN, Nana LA, Yerbanga I, Lingani M, Kazienga A, et al. Ex vivo anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malaria journal*. 2014; 13(1):207.
10. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014; 505(7481):50–5. doi: [10.1038/nature12876](#) PMID: [24352242](#)
11. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *New England journal of medicine*. 2001; 344(4):257–63. PMID: [11172152](#)
12. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet infectious diseases*. 2002; 2(4):209–18. PMID: [11937421](#)
13. Dahlström S, Ferreira PE, Veiga MI, Sedighi N, Wiklund L, Mårtensson A, et al. *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa. *Journal of Infectious Diseases*. 2009; 200(9):1456–64. doi: [10.1086/606009](#) PMID: [19807279](#)
14. Badolo A, Traore A, Jones CM, Sanou A, Flood L, Guelbeogo WM, et al. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise. *Malaria journal*. 2012; 11(1):232.
15. Ministry of health of Burkina Faso /DSN. Plan d’action 2014 du district sanitaire de Nanoro. 2013.

16. Derra K, Rouamba E, Kazienga A, Ouedraogo S, Tahita MC, Sorgho H, et al. Profile: Nanoro health and demographic surveillance system. *International journal of epidemiology*. 2012; 41(5):1293–301. doi: [10.1093/ije/dys159](https://doi.org/10.1093/ije/dys159) PMID: [23045201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045201/)
17. Sondo P, Derra K, Diallo-Nakanabo S, Tarnagda Z, Zampa O, Kazienga A, et al. Effectiveness and safety of artemether–lumefantrine versus artesunate–amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated falciparum malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria journal*. 2015; 14(1):325.
18. Ranford-Cartwright L, Taylor J, Umasunthar T, Taylor L, Babiker H, Lell B, et al. Molecular analysis of recrudescence parasites in a Plasmodium falciparum drug efficacy trial in Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 91(6):719–24. PMID: [9509189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9509189/)
19. Dorsey G, Kamya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the Plasmodium falciparum pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *Journal of Infectious Diseases*. 2001; 183(9):1417–20. PMID: [11294677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11294677/)
20. Sondo P, Derra K, Tarnagda Z, Nakanabo SD, Zampa O, Kazienga A, et al. Dynamic of plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene Pfcrt K76T mutation five years after withdrawal of chloroquine in Burkina Faso. *Pan African Medical Journal*. 2015; 21(101).
21. Somé AF, Séré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, et al. Selection of known Plasmodium falciparum resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(5):1949–54. doi: [10.1128/AAC.01413-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01413-09) PMID: [20231394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20231394/)
22. Baraka V, Tinto H, Valea I, Fitzhenry R, Delgado-Ratto C, Mbonye MK, et al. In Vivo Selection of Plasmodium falciparum Pfcrt and Pfmdr1 Variants by Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine in Burkina Faso. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015; 59(1):734–7. Epub 2014/11/19. doi: [10.1128/aac.03647-14](https://doi.org/10.1128/aac.03647-14) PMID: [25403659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403659/); PubMed Central PMCID: [PMC4291431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4291431/).
23. Dokomajilar C, Nsoyba SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50(5):1893–5. PMID: [16641472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16641472/)
24. Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman A, et al. In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *Journal of Infectious Diseases*. 2005; 191(6):1014–7. PMID: [15717281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15717281/)
25. Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, et al. In vivo selection of Plasmodium falciparum parasites carrying the chloroquine-susceptible pfcrt K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *Journal of Infectious Diseases*. 2009; 199(5):750–7. doi: [10.1086/596738](https://doi.org/10.1086/596738) PMID: [19210165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19210165/)
26. Venkatesan M, Gadalla NB, Stepniewska K, Dahal P, Nsanzabana C, Moriera C, et al. Polymorphisms in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for P. falciparum malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014; 91(4):833–43. doi: [10.4269/ajtmh.14-0031](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0031) PMID: [25048375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25048375/)
27. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003; 69(2):184–7. PMID: [13677373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13677373/)
28. Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemde RT, D'Alessandro U, Ouedraogo JB. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2008; 13(2):238–40. Epub 2008/02/29. doi: [10.1111/j.1365-3156.2007.01995.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01995.x) PMID: [18304270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18304270/).
29. Mungthin M, Khositnithikul R, Sitthichot N, Suwandittakul N, Wattanaveeradej V, Ward SA, et al. Association between the pfmdr1 gene and in vitro artemether and lumefantrine sensitivity in Thai isolates of Plasmodium falciparum. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010; 83(5):1005–9. doi: [10.4269/ajtmh.2010.10-0339](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0339) PMID: [21036827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21036827/)
30. Humphreys G, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty C, Mutabingwa T, Sutherland C, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the Plasmodium falciparum mdr1 gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51(3):991–7. PMID: [17194834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17194834/)