



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2018

IDENTIFICATION ET VALIDATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES
DANS LA DIMINUTION DE SENSIBILITE A LA PIPERAQUINE CHEZ *Plasmodium
falciparum*

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Marie Gladys ROBERT

Né(e) le : 15/11/1988 à : Le Port

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 25/10/2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Madame la Professeure Muriel CORNET

Membres :

Madame le Docteur Delphine ALDEBERT

Madame le Docteur Marie-Pierre BRENIER-PINCHART

Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX

Monsieur le Docteur Bruno PRADINES (directeur de thèse)

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.



Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2018 - 2019

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
DCE	BOULADE	MARINE	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
DCE	BOUVET	RAPHAEL	HP2 – INSERM U1042
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
AHU	CHANOINE	SEBASTIEN	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309, Equipe d'épidémiologie environnementale
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
DCE	COUCHET	MORGANE	LBFA – INSERM U1055
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS

Mise à jour le 7/09/2018

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF Émérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
AHU	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Émérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Émérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
DCE	LE	CONG ANH KHANH	CERMAV
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	-
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
DCE	MONTEMAGNO	CHRISTOPHER	LRB- INSERM U1039
DCE	MOULIN	SOPHIE	HP2 – INSERM U1042
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS

Mise à jour le 7/09/2018

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
DCE	TAHER	RALEB	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
DCE	VERNET	CELINE	Université de Berkley
DCE	VRAGNIAU	CHARLES	UVHCI
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 7/09/2018

Remerciements

À chacun des membres de ce jury,

À Madame la Professeure Muriel Cornet, merci de me faire l'honneur de présider ce jury, et d'avoir accepté de tutorer la rédaction de ce manuscrit. Merci aussi et surtout pour m'avoir initiée à la recherche et à la mycologie, et pour votre confiance dès mes premiers pas dans ces domaines.

À Monsieur le Docteur Bruno Pradines, merci de m'avoir accueillie dans votre unité, de m'avoir confié ce projet et de m'avoir guidée tout au long de sa réalisation. J'ai beaucoup appris grâce à vous, et je vous en remercie.

À Madame le Docteur Marie-Pierre Brenier-Pinchart, merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée au cours de la rédaction de ce manuscrit. Plus largement, merci de m'avoir accompagnée et soutenue tout au long de mon parcours d'interne. Je suis ravie que cela se poursuive au-delà.

À Madame le Docteur Delphine Aldebert, vos cours à la faculté de pharmacie m'ont initiée à la parasitologie, et je suis ravie que vous ayez accepté de juger ce travail aujourd'hui.

À Monsieur le Professeur Hervé Pelloux, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour la confiance que vous m'avez si souvent renouvelée au cours de mes 4 stages dans votre service. Et merci pour cette porte toujours ouverte, même quand elle ne l'est pas.

À toutes les équipes au sein desquelles j'ai eu l'honneur de m'intégrer,

À toute l'équipe du CNR paludisme de Marseille, merci pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés. Je suis rentrée grandie de cette année à Marseille grâce à vous tous.

À l'équipe du laboratoire de parasitologie et mycologie du CHU de Grenoble,

À Cécile Garnaud et Céline Dard. C'est en vous regardant que j'ai trouvé ma voie.

À l'ensemble des biologistes, à ceux cités ci-dessus, ainsi qu'aux Docteurs Odile Cognet, Hélène Fricker-Hidalgo, et Danièle Maubon. Pour votre disponibilité, votre passion et votre enthousiasme si communicatifs pour votre belle discipline, merci.

À l'ensemble des techniciens, Valérie, Mélody, Ali, Laurène, Florent, Maud, Mélanie, Manon, Emmanuelle, et à tous ceux que j'ai croisés au cours de mes différents stages dans ce service. C'est un plaisir de travailler à vos côtés.

À l'ensemble des biologistes du laboratoire de microbiologie du CHU de La Réunion. Merci pour vos précieux enseignements et votre encadrement toujours bienveillant.

À mes amis,

À Arnaud, Eléna, Aurélie, Clémentine, Fanny A, Claire, Réza, Charlotte, Léa, et Fanny Z, et à vous tous qui avez égaillé mon internat grenoblois, merci pour les gardes, les cafés, les projets et les soirées partagés.

À Anthony et Jérémy, mes co-internes d'outre-mer, pour ce semestre ensoleillé à vos côtés.

À Toscane, David et Francis : "Il n'y a pas de plaisir comparable à celui de rencontrer un vieil ami, excepté peut-être celui d'en faire un nouveau."

À vous, amis de toujours, Pascal, Caro, Ariane, Maguelonne, Gaëtan, Myriam et Amandine, pour tous ces bons moments partagés aux quatre coins de la France, et pour tous ceux qui viendront encore.

À toute ma famille, ici et là-bas, votre soutien est ma force. Merci.

À Catherine, parce que c'est si bon d'avoir une deuxième maman.

À Vincent, parce que tu me rends chaque jour un peu plus fier d'être ta sœur. Et à Camille, parce que tu me rends chaque jour un peu plus fier d'être ta belle-sœur. Vous vous êtes quand même sacrément bien trouvés !

À mes parents, vous êtes mes racines et mes ailes...

À Clément...

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. Paludisme et <i>Plasmodium</i>	13
1.1. Origine et Histoire de la maladie	13
1.2. Epidémiologie, impact et stratégies internationales	14
1.2.1. Chiffres	14
1.2.2. Impact socio-économique	16
1.2.3. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme	17
1.3. Agent causal	17
1.3.1. Classification phylogénétique	17
1.3.2. Espèces et répartition géographique	19
1.3.3. Cycle parasitaire et vecteur	22
1.3.4. Génome et vue d'ensemble du métabolisme	24
1.4. Clinique et physiopathologie	26
1.5. Diagnostic biologique	27
1.5.1. Frottis mince	28
1.5.2. Goutte épaisse	28
1.5.3. Quantitative buffy coat	29
1.5.4. Test de diagnostic rapide	29
1.5.5. Biologie moléculaire	30
1.5.6. Sérologie	30
2. Thérapeutique et prévention	30
2.1. Principaux antipaludiques et mécanismes d'action	31
2.1.1. Schizonticides érythrocytaires	31
2.1.1.1. Dérivés quinoléiques	31
2.1.1.2. Dérivés de l'artémisinine	32
2.1.2. Inhibiteurs des acides nucléiques	33
2.1.2.1. Antifolates	33
2.1.2.2. Naphtoquinones	33
2.1.3. Antibiotiques	34
2.2. La pipéraquline, antipaludique remis au goût du jour	34
3. Résistance aux antipaludiques	35
3.1. Méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antipaludiques	36
3.1.1. Evaluations <i>in vivo</i> : Etudes d'efficacité thérapeutique	36
3.1.2. Evaluations <i>in vitro</i>	36
3.1.3. Les marqueurs moléculaires et leurs méthodes d'identification	39
3.1.3.1. Cartographie des liaisons	40
3.1.3.2. Etude d'association génétique : gènes candidats et études d'association pangénomique	41
3.1.3.3. Culture sous pression	42
3.2. Etat des lieux de la résistance aux antipaludiques	42
3.2.1. Les leçons de l'Histoire et la situation actuelle	42

3.2.2. Modalités d'apparition	45
3.2.3. Marqueurs de résistance identifiés	46
TRAVAIL EXPERIMENTAL	51
1. Objectifs de l'étude et stratégie expérimentale.....	51
2. Matériels et méthodes	52
2.1. Isolats de <i>P. falciparum</i>	52
2.2. Détermination de la sensibilité ex vivo à la pipéraquline.....	53
2.3. Extraction d'ADN.....	54
2.4. PCR quantitative sur gène <i>Plasmepsin 2</i> (qPCR).....	54
2.5. Séquençage Sanger des gènes <i>Pfpare</i> et <i>Pfcarl</i>	56
2.6. Culture sous pression discontinue de pipéraquline	58
2.6.1. Souche, parasitémie et conditions de culture.....	58
2.6.2. Détermination de la concentration initiale de pipéraquline à utiliser et de la durée des pressions.....	59
2.6.3. Déroulement des cycles de pression.....	59
3. Résultats.....	60
3.1. Quantification du nombre de copies du gène <i>Plasmepsin 2</i>	60
3.2. Recherche de mutations sur <i>Pfpare</i> et <i>Pfcarl</i>	62
3.3. Détermination de la concentration initiale de pipéraquline à utiliser et de la durée des pressions.....	64
3.4. Initiation du protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline.....	66
4. Discussion.....	68
CONCLUSION.....	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74
ANNEXES	83

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU PALUDISME EN FONCTION DE L'ESPECE IMPLIQUEE.....	19
TABLEAU II. CRITERES DE GRAVITE DU PALUDISME D'IMPORTATION.....	27
TABLEAU III. MARQUEURS MOLECULAIRES DE RESISTANCE DE <i>P. FALCIPARUM</i> PAR ANTIPALUDIQUES.....	50
TABLEAU IV. LISTE DES AMORCES ET SONDAS UTILISEES POUR LA QUANTIFICATION DU NOMBRE DE COPIES DU GENE <i>PFFPM2</i>	55
TABLEAU V. COMPOSITION DES MELANGES REACTIONNELS UTILISES POUR LA DETERMINATION DU NOMBRE DE COPIES DU GENE <i>PFFPM2</i>	56
TABLEAU VI. AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION ET LE SEQUENÇAGE DES GENES <i>PFCARL</i> ET <i>PFPARE</i>	57
TABLEAU VII. COMPOSITION DES MELANGES REACTIONNELS D'AMPLIFICATION DES FRAGMENTS DES GENES <i>PFCARL</i> ET <i>PFPARE</i>	57
TABLEAU VIII. PROGRAMME D'AMPLIFICATION DU GENE <i>PFCARL</i>	57
TABLEAU IX. PROGRAMME D'AMPLIFICATION DU GENE <i>PFPARE</i>	58
TABLEAU X. REPRESENTATION DES SNPs SUR <i>PFPARE</i> DECRITS COMME ASSOCIES A LA MULTIREISITANCE ET DES SNPs RETROUVES DANS CE PROJET PARMY NOS ISOLATS.....	63
TABLEAU XI. COMPARAISON DES VALEURS DE CI_{50} MOYENNES ENTRE LES ECHANTILLONS PORTEURS D'ALLELES MUTANTS ET D'ALLELES SAUVAGES.	63
TABLEAU XII. REPRESENTATION DES SNPs SUR <i>PFCARL</i> DECRITS COMME ASSOCIES A LA MULTIREISITANCE ET DES SNPs RETROUVES DANS CE PROJET PARMY NOS ISOLATS.....	63

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. POURCENTAGES DU NOMBRE TOTAL DE CAS DE PALUDISME PAR PAYS	15
FIGURE 2. PAYS D'ENDEMIE PALUSTRE	16
FIGURE 3. OBJECTIFS, PILIERS ET ELEMENTS D'APPUI DE LA STRATEGIE TECHNIQUE MONDIALE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME 2016 – 2030	17
FIGURE 4. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DE <i>PLASMODIUM</i>	18
FIGURE 5. ORGANISATION DES EUCARYOTES.....	19
FIGURE 6. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES VECTEURS DU PALUDISME.	23
FIGURE 7. CYCLE BIOLOGIQUE DES ANOPHELES.	24
FIGURE 8. CYCLE DE <i>PLASMODIUM</i>	24
FIGURE 9. VUE D'ENSEMBLE DES VOIES METABOLIQUES DE <i>P. FALCIPARUM</i>	25
FIGURE 10. LOGIGRAMME DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME	28
FIGURE 11. DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE OPEREE PAR <i>PLASMODIUM SPP</i>	32
FIGURE 12. VOIE DE SYNTHESE DE L'ACIDE FOLIQUE ET MECANISME D'ACTION DES ANTIFOLATES	33
FIGURE 13. STRUCTURE CHIMIQUE DE LA PIPERAQUINE.....	35
FIGURE 14. PRINCIPE DE L'EVALUATION IN VITRO DE LA SENSIBILITE AUX ANTIPALUDIQUES.....	39
FIGURE 15. PRINCIPE DE LA CARTOGRAPHIE DE LIAISON.....	41
FIGURE 16. APPARITION ET PROPAGATION DE LA RESISTANCE A LA CHLOROQUINE.	44
FIGURE 17. INTRODUCTION DES ANTIPALUDIQUES ET APPARITION DES RESISTANCES (81,111–114).	45

FIGURE 18. RESUME DE LA STRATEGIE EXPERIMENTALE UTILISEE POUR LA VALIDATION DES CANDIDATS MARQUEURS PFPM2, PFCARL ET PFPARE	52
FIGURE 19. ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES ISOLATS DE L'ETUDE	53
FIGURE 20. VALIDATION DE LA METHODE DES $\Delta\Delta Ct$: $\Delta Ct = F[\text{LOG}(\text{DILUTION D'ADN})]$	56
FIGURE 21. DISTRIBUTION DES CI_{50} A LA PIPERAQUINE DES ISOLATS ANALYSES EN TERMES DE NOMBRE DE COPIES DU GENE <i>PFPM2</i> . LA DROITE ROUGE REPRESENTE L' CI_{50} MOYEN. LES POINTS CORRESPONDANT AUX ISOLATS RESISTANTS A LA PIPERAQUINE SONT ENTOURES EN ROUGE.....	61
FIGURE 22. NOMBRE DE COPIES DU GENE <i>PFPM2</i> EN FONCTION DE L' CI_{50} A LA PIPERAQUINE. LA DROITE EN POINTILLE REPRESENTA LA DROITE DE REGRESSION LINEAIRE.	61
FIGURE 23. RATIO DES PARASITEMIES A 24, 48 ET 72 POST PRESSION (P_i) SUR LA PARASITEMIE INITIALE (P_0) POUR DIFFERENTES PRESSIONS DE 24H	65
FIGURE 24. RATIO P_i/P_0 EN FONCTION DE LA PRESSION APPLIQUEE PENDANT 48H.	65
FIGURE 25. SCHEMA DU PROTOCOLE DE CULTURE SOUS PRESSION DISCONTINUE DE PIPERAQUINE.....	66
FIGURE 26. PRESSIONS DE PPQ APPLIQUEES AU COURS DU PROTOCOLE DANS LES FLASQUES A, B ET C.	67
FIGURE 27. EVOLUTION DES CI_{50} DANS LES 3 FLASQUES SOUS PRESSION ET DANS LA FLASQUE TEMOIN.	67

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette

ACT : *Artemisinin-based combination therapy* (Association à base d'artémisinine)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARMD : *Accelerated resistant to multidrug*

CDC : Center for disease control and prevention (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies)

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50 %

CNR : Centre national de référence

Ct : Cycle seuil (*cycle threshold*)

DHA : Dihydroartémisinine

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHPS : Dihydropteroate synthase

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DO : densité optique

EFS : Etablissement français du sang

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

GTS : *Global technical strategy for malaria* (Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme)

GWAS : *Genome-wide association studies* (Etudes d'association pangénomique)

HRP2 : *Histidine-rich protein 2*

IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées

J : Jours

LAMP : *Loop-mediated isothermal amplification* (amplification isotherme de l'ADN facilité par boucle)

LDH : Lactate déshydrogénase

N : Nombre de copies du gène de la *Pfpm2*

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : *Polymerase chain reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)

PPQ : Pipéraquline

RFLP : *Restriction fragment length polymorphism* (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RSA : Ring-stage survival assay

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

TDR : Test de diagnostic rapide

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie vectorielle causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et responsable d'accès fébriles pouvant être mortels. En 2016, les estimations font état de 445 000 décès dus à cette maladie (1). Ces chiffres sont en baisse grâce aux différentes stratégies de lutte mises en place, mais il est nécessaire de maintenir les efforts pour atteindre la cible de la Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme (GTS). Celle-ci vise d'ici à 2030, à diminuer l'incidence et la mortalité du paludisme de 90% par rapport à 2015, à éliminer cette maladie dans au moins 35 pays où elle sévit encore, et à empêcher sa réapparition dans les pays aujourd'hui exempts (2).

Six espèces de *Plasmodium* sont susceptibles d'affecter l'Homme : *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium falciparum*. Parmi elles, *Plasmodium falciparum* se distingue par son implication dans la quasi-totalité des formes de paludisme graves et sa capacité à développer des résistances aux traitements antipaludiques.

En effet, le déploiement de nouveaux antipaludiques est jusqu'à présent systématiquement suivi de l'émergence de résistances. Les associations à base d'artémisinine (ACT, artemisinin based combination therapy) sont actuellement la pierre angulaire du traitement des accès simples à *P. falciparum*. Six ACT ont été développés dans cette indication : artéméther-luméfantrine, artésunate-amodiaquine, artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, artésunate-méfloquine, artésunate-pyronaridine et dihydroartémisinine-pipéraquine. Cette dernière combinaison associe une quinoléine à un dérivé de l'artémisinine. Elle est apparue récemment sur le marché et est commercialisée en France depuis 2012, mais l'émergence de résistances est déjà à déplorer dans le sud-est asiatique et risque de limiter d'avantage les options thérapeutiques disponibles (3,4).

La bonne gestion de la résistance aux antipaludiques est l'une des clés pour contrôler le paludisme. Elle passe par l'identification de marqueurs moléculaires de résistance. Ces polymorphismes associés à la résistance à un ou plusieurs antipaludiques sont généralement des modifications du nombre de copies d'un gène ou des variations d'un nucléotide. Ces outils facilitent la surveillance de la propagation des allèles associés à la résistance. Différentes approches peuvent être utilisées pour identifier de nouveaux marqueurs

moléculaires de résistance. Parmi elles, l'induction de résistance *in vitro* par culture sous pression, et l'étude du génome du clone résistant ainsi obtenu.

Des marqueurs moléculaires de résistance ont pu être mis en évidence pour différents antipaludiques, et notamment pour les dérivés de l'artémisinine. Pour ce qui est de la résistance à la pipéraquline en revanche, si l'augmentation du nombre de copies du gène *Plasmepsin 2* a été mise en cause en Asie du sud-est (5,6), sa présence et son implication dans la résistance en Afrique ne sont pas encore démontrés. D'autre part, des mutations sur certains gènes comme *pfcarl* et *Pfpare* ont récemment été mises en cause dans la multi-résistance à de nouvelles classes d'antipaludiques. Cela fait de ces gènes des candidats marqueurs pour les antipaludiques actuellement sur le marché, et notamment la pipéraquline.

L'objectif de ce travail était d'identifier des marqueurs moléculaires impliqués dans la diminution de sensibilité à la pipéraquline. Deux approches ont été suivies pour cela : d'une part la recherche de l'implication des candidats marqueurs moléculaires *Plasmepsin 2*, *Pfpare* et *Pfcarl* dans la résistance à la pipéraquline d'isolats africains *via* une étude d'association phénotype-génotype, et d'autre part la mise au point d'un protocole de culture sous pression de pipéraquline en vue d'obtenir un clone résistant et d'identifier les mutations qui sous-tendent cette résistance.

Les résultats de cette étude seront présentés après quelques rappels bibliographiques sur le paludisme et la résistance aux antipaludiques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Paludisme et *Plasmodium*

1.1. Origine et Histoire de la maladie

Les modalités d'apparition des espèces plasmodiales et de leur adaptation à l'être humain sont sujets à controverse (7–12). Sans entrer dans le débat pour savoir qui de l'Afrique ou de l'Asie a vu naître ce ménage à trois entre *Anopheles*, *Plasmodium* et *Homo sapiens* (bien qu'il faille reconnaître un sensible avantage à l'Afrique), ou qui du Chimpanzé ou du Gorille a joué les entremetteurs dans cette « idylle », force est de constater que ce trio existe depuis des millénaires.

Plus encore qu'une coexistence, peut-être convient-il mieux de parler d'une coévolution. L'émergence d'une nouvelle activité humaine, l'agriculture, autour de 10 000 avant J.C, a probablement créé les conditions idéales à la stupéfiante expansion de *P. falciparum*, qui se transmettait déjà à bas bruit et à plus petite échelle, depuis des dizaines de milliers d'années (7,13). Mais chaque acteur a joué un rôle important dans la conception du tableau actuel, et la pression de sélection exercée par le paludisme a modelé au fil des siècles le génome humain. En témoignent les nombreux polymorphismes sur les gènes du métabolisme érythrocytaire, sélectionnés dans diverses régions du monde du fait de la protection qu'ils confèrent vis-à-vis de cette maladie. Ainsi, drépanocytose, thalassémie et déficit en Glucose-6-Phosphate déshydrogénase entre autres, doivent leur prévalence au paludisme (14).

Depuis des millénaires donc, l'Homme et le paludisme cohabitent. C'est ainsi sans grande surprise finalement, que l'ADN de *P. falciparum* a été retrouvé dans des momies égyptiennes de plus de 3000 ans, et notamment dans celle de Toutankhamon dont la mort est peut-être même due à ce parasite (15,16). Sans doute ne saura-t-on jamais combien de destins, royaux ou pas, ont pu être scellés par le paludisme, mais toujours est-il que son impact sur la grande Histoire, et sur l'imaginaire de l'homme, est indéniable. Si bien que des traces écrites décrivant ce qui semble être la symptomatologie du paludisme, fleurissent

depuis l'antiquité (17). Le papyrus d'Ebers, rédigé en 1500 avant J.C, fait par exemple référence à une splénomégalie associée à de la fièvre et des frissons (18).

L'écorce de quinquina, arbre originaire d'Amérique du Sud, constitue le premier remède utilisé contre le paludisme. Les jésuites en ont assuré la promotion en Europe dès 1630. En 1820, le procédé d'extraction de la quinine, alcaloïde actif, sera découvert par les pharmaciens français Pelletier et Caventou, standardisant et démocratisant ainsi ce traitement des fièvres périodiques (19).

Mais si la maladie ainsi que le moyen de s'en prémunir sont connus depuis plusieurs siècles, il faut attendre 1880, et la ténacité du médecin de l'armée française Alphonse Laveran, alors basé à Constantine en Algérie, pour en découvrir le coupable (20). Il lui faudra ensuite quelques années avant que ne soit acceptée des plus éminents malariologistes de l'époque, l'idée selon laquelle le paludisme est dû à un protozoaire plutôt qu'à une bactérie. Cette découverte lui vaudra l'attribution d'un prix Nobel en 1907. C'est ensuite à Patrick Manson, Ronald Ross et Battista Grassi que l'on doit l'élucidation du cycle sexué de *Plasmodium*, et de son mode de transmission par piqûre de moustiques *Anopheles*. Le moustique et le « mauvais air » (*mal'aria* en italien) que constitue son environnement marécageux, sont depuis longtemps associés au paludisme, mais la voie par laquelle celui-ci est inoculé n'est ainsi découverte qu'en 1898 (17). Fait étonnant, le prix Nobel de physiologie et de médecine viendra récompenser Ross (et lui seul) en 1902 pour la découverte du cycle de *Plasmodium*, cinq ans avant celui décerné à Laveran pour la découverte du parasite lui-même.

1.2. Epidémiologie, impact et stratégies internationales

1.2.1. Chiffres

Le rapport de l'OMS sur le paludisme fait encore état en 2016 de 216 millions de cas, pour la plupart (90 %) enregistrés en Afrique (1). Quinze pays concentrent 80 % des cas (**Figure 1**), mais le paludisme sévit encore dans 91 pays de la zone intertropicale (**Figure 2**), et près de la moitié de la population est exposée. Le nombre de décès dus au paludisme à travers le monde a été estimé à 445 000 en 2016, et 80 % d'entre eux sont survenus en

Afrique. Près des deux tiers de ces décès concernaient des enfants de moins de 5 ans, population particulièrement vulnérable face à cette maladie.

En France en 2016, on estime le nombre de cas d'importation à 4690. Dans 97,5 % des cas, la contamination s'est produite en Afrique et dans 86,4 % des cas, *P. falciparum* est impliqué. Il est à noter que deux cas présumés autochtones ont été déclarés au centre national de référence (CNR) cette même année (21).

Par rapport à 2010, une diminution de l'incidence de 18 % est décrite au niveau mondial. La mortalité du paludisme est aussi en baisse sur la même période. Ces chiffres encourageants doivent cependant être nuancés par le fait que la baisse amorcée depuis 2010 subit un net ralentissement depuis quelques années. La mortalité a en effet quasiment stagné entre 2015 et 2016. Quant à l'incidence, elle a même quelque peu augmenté entre 2014 et 2016, passant de 210 000 à 216 000 cas.

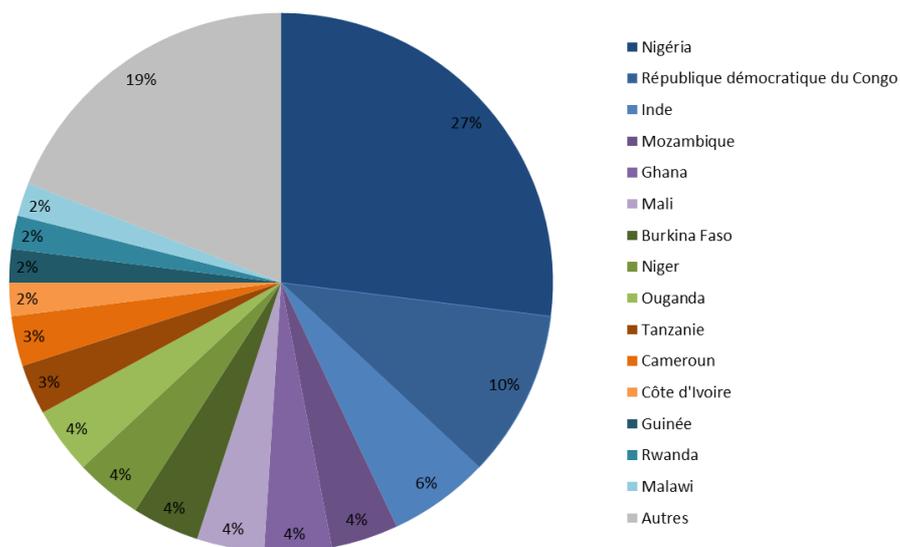


Figure 1. Pourcentages du nombre total de cas de paludisme par pays (d'après l'OMS, 2016 (1))

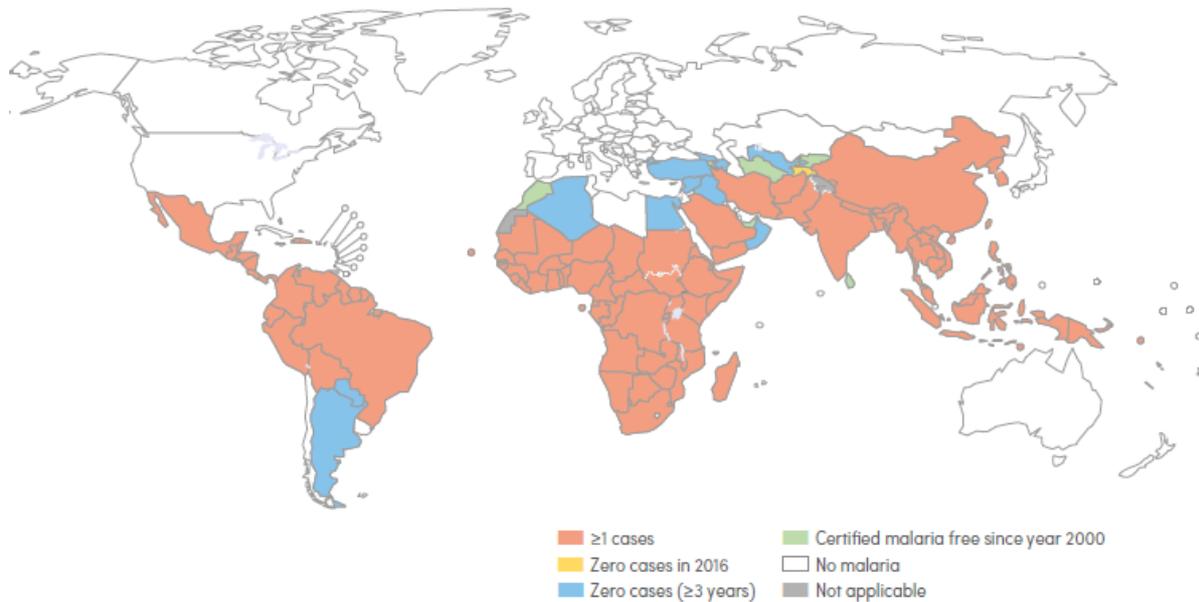


Figure 2. Pays d'endémie palustre (d'après l'OMS, 2016 (1))

1.2.2. Impact socio-économique

Outre les conséquences en termes de morbi-mortalité que représente la maladie, des conséquences sur le plan socio-économique sont aussi à déplorer. En effet, il existe une corrélation entre pauvreté et paludisme (22). Si les liens de causalité sont probablement bidirectionnels, le poids du paludisme ne doit pas être négligé, car la croissance économique est nettement moindre dans les pays impaludés, et les pays qui parviennent à éliminer la maladie connaissent par la suite une croissance plus importante que celle de leurs voisins encore impactés (23).

Le paludisme entraîne des conséquences directes sur la démographie, mais ses conséquences indirectes sont plus difficiles à quantifier. Par exemple, la mortalité infantile est liée au taux de fertilité, et en découlent donc les effets néfastes associés notamment sur les revenus du foyer et l'éducation des filles. D'autre part, l'impact du paludisme sur la productivité, les performances ou la capacité d'apprentissage ne peut être nié (24), et laisse entrevoir les bénéfices qui pourraient être tirés d'une lutte efficace contre le paludisme à travers le monde.

1.2.3. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme

Pour faire face au challenge que représente le combat contre le paludisme, l’OMS a élaboré un plan de bataille intitulé « Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016 – 2030 » (25), qui propose des objectifs ambitieux et un cadre pour les atteindre, en s’appuyant sur trois piliers (accès à la prévention, au diagnostic et au traitement, accélération des efforts vers l’élimination et surveillance), et deux éléments de soutien (innovation et recherche, et favorisation d’un environnement propice). L’ensemble des objectifs et des éléments d’appui sont repris dans la **Figure 3**.

La surveillance de l’efficacité des antipaludiques et la gestion de la résistance à ces molécules font partie intégrante de cette stratégie d’action.

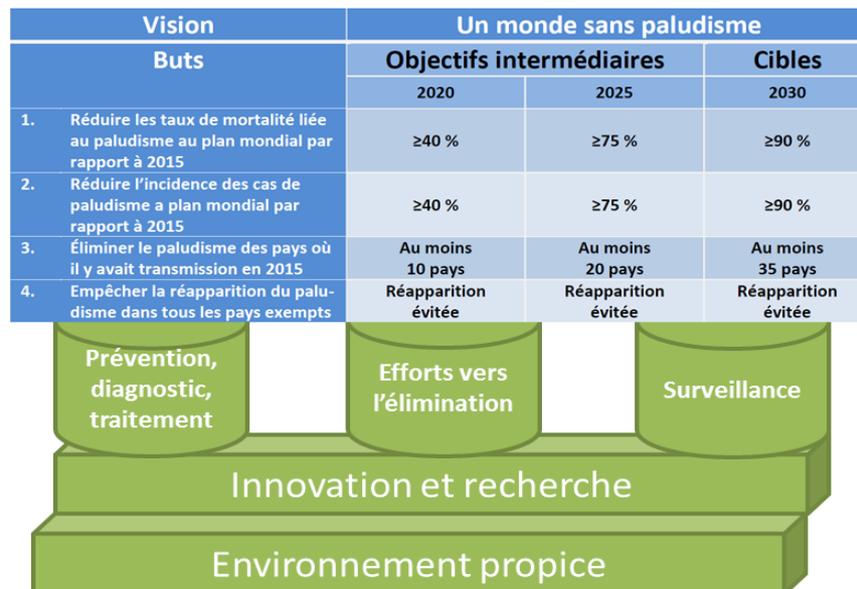


Figure 3. Objectifs, piliers et éléments d’appui de la Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016 – 2030 (adapté de l’OMS)

1.3. Agent causal

1.3.1. Classification phylogénétique

La classification des êtres vivants évolue au fil des courants de pensées et des avancées technologiques. La systématique phylogénétique, qui classe les organismes en

fonction de leur degré de parenté (26), prévaut aujourd’hui sur la classification linnéenne, et l’essor de la biologie moléculaire a modifié considérablement la position de nombreuses espèces. Mais les hypothèses coexistent bien souvent (27–30).

La classification présentée ici et résumée sur la **Figure 4** est celle proposée par la société internationale de protozoologistes (30), qui veut que les Eucaryotes, organismes dotés de cellules nucléées, soient répartis en super-groupes que sont Amoebozoa, Opisthokonta, Excavata, Archaeplastida et Sar (**Figure 5**). C’est dans ce dernier que se situe le groupes des Alveolata (protistes présentant des vésicules sous-membranaires), comprenant le phylum des Apicomplexa, dont le nom fait référence au complexe apical que possèdent ces parasites obligatoires, et qui est constitué d’un ensemble d’organites (micronèmes, rhoptries, anneaux polaires...). Ce phylum regroupe, outre *Plasmodium*, de nombreux genres impliqués en pathologie humaine et vétérinaire, tels que *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* ou *Babesia*. Au sein de ce phylum, le genre *Plasmodium* se positionne dans le groupe des Aconoidasida (hétéroxènes et sans conoïde au cours des phases asexuées), et dans le sous-groupe des Haemosporidia (ookinètes avec conoïde).

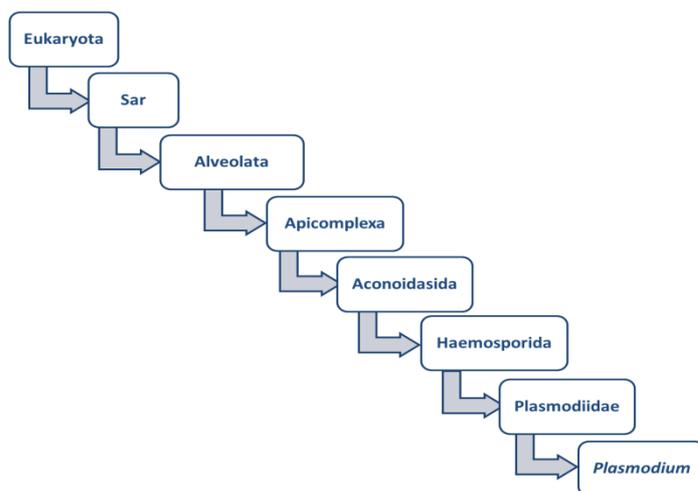


Figure 4. Classification phylogénétique de *Plasmodium*.

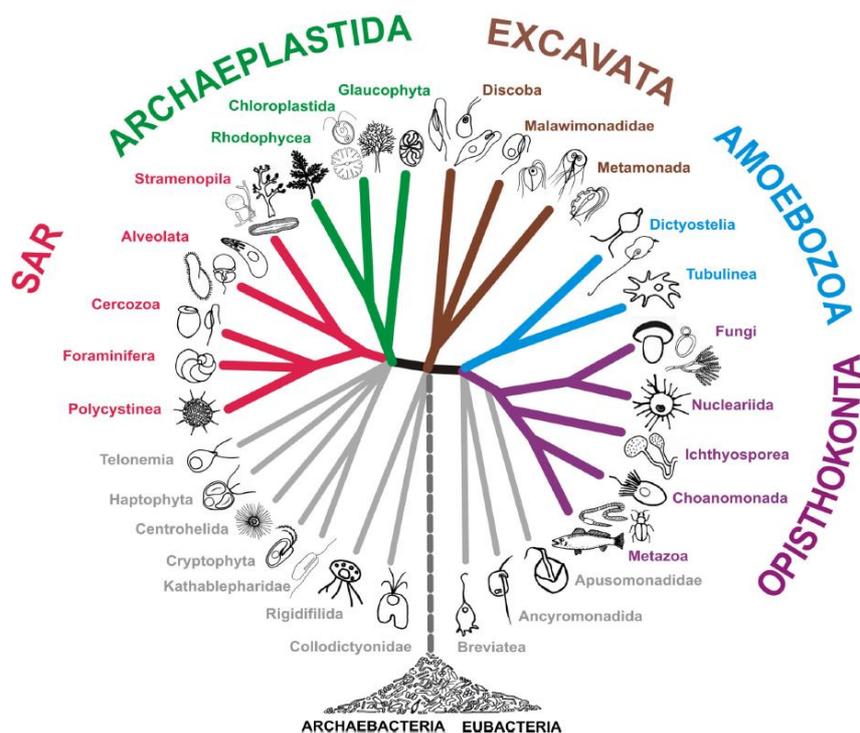


Figure 5. Organisation des eucaryotes (d'après Adl et al. (30))

1.3.2. Espèces et répartition géographique

Six espèces plasmodiales sont retrouvées en pathologie humaine. Elles diffèrent non seulement par leur morphologie, mais aussi par leur répartition géographique et leur présentation clinique. Les principales caractéristiques de chacune des espèces sont regroupées dans le **Tableau I**.

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale curtisi</i> et <i>P. ovale wallikeri</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
Délai d'incubation moyen	8 - 12 jours	8 – 17 jours	10 – 17 jours	18 – 40 jours	5 jours
Durée du cycle érythrocytaire	48h	48h	48h	72h	24h
Répartition géographique	Afrique Asie Amérique du Sud Moyen-Orient	Asie Moyen-Orient Amérique du Sud Est africain et Madagascar	Afrique sub-saharienne Plus limitée en Asie	Afrique Asie Amérique du Sud Moyen-Orient (sporadique)	Sud-est asiatique
Rechutes	Non	Oui (hypnozoïtes)	Oui (hypnozoïtes)	Recrudescences possibles à distance mais absence d'hypnozoïtes	
Sévérité	Potentiellement sévère (agent du neuropaludisme)	Généralement bénin (rares cas sévères)	Bénin	Bénin mais risque de syndrome néphrotique	Potentiellement sévère

Tableau I. Principales caractéristiques du paludisme en fonction de l'espèce impliquée.

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus pathogène. Elle est incriminée dans la quasi-totalité des formes graves, et est associée à la mortalité la plus importante. Elle est responsable des fièvres tierces (périodicité des symptômes d'environ 48h) dites malignes, apparaissant après une période d'incubation de 8 à 12 jours en moyenne, et majoritairement dans les 2 mois après la piqûre infectante (31). À l'examen direct, les frottis sont qualifiés de « monomorphes », car hormis la présence occasionnelle de gamétocytes, seuls les trophozoïtes sont retrouvés. Les schizontes et corps en rosace sont en effet séquestrés au niveau de la microcirculation. La parasitémie peut être élevée du fait de la capacité des mérozoïtes de cette espèce à infecter des globules rouges de tout âge (32). Il s'agit de l'espèce la plus fréquemment en cause dans les cas de paludisme en Afrique (99 % des cas de paludisme en Afrique sont en effet imputables à cette espèce), mais elle est aussi largement représentée dans toutes les zones impaludées.

Hors continent africain, c'est *Plasmodium vivax* qui est l'espèce prépondérante. En effet, si elle ne concerne que 0,4% des cas de paludisme sur le continent africain (plus représentés à l'est de l'Afrique), elle est en revanche répandue en Amérique du sud, au Moyen-Orient, dans le sud-est asiatique, et dans le Pacifique. La quasi-absence de cette espèce en Afrique sub-saharienne s'expliquait jusqu'à récemment par la grande part de la population ne portant pas l'antigène Duffy à la surface de leurs hématies dans cette région. Il était en effet admis que cette protéine était indispensable à *P. vivax* pour entrer dans l'hématie. Cette affirmation n'est plus aussi catégorique depuis que la possibilité d'infection par *P. vivax* a été mise en évidence dans des populations Duffy-négative (33). Cette espèce est responsable de fièvres tierces qualifiées de bénignes, pourtant elles peuvent parfois se révéler sévères (34–36). La période d'incubation est plus longue que celle de *P. falciparum*, de l'ordre de 12 jours à plusieurs mois. Mais ce qui distingue les deux espèces cliniquement, c'est surtout le risque de rechute suite à une infection par *P. vivax* du fait de formes hépatiques quiescentes, les hypnozoïtes (37). Contrairement à *P. falciparum*, toutes les formes du cycle érythrocytaire de *P. vivax* peuvent être retrouvées au frottis. La parasitémie généralement moins élevée est attribuée à la limitation des mérozoïtes à infecter plutôt les érythrocytes jeunes (32).

Plasmodium ovale a été identifié en 1922 par Stephens (38), soit bien après *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. malariae*. Les raisons de ce délai sont multiples. D’abord, *P. ovale* et *P. vivax* sont difficiles à distinguer sur le plan clinique (tous deux sont responsables de fièvres tierces « bénignes » récidivantes du fait de la présence d’hypnozoïtes), et leur morphologie au frottis est assez similaire (hématies parasitées volumineuses, granulations de Schüffner). Il se peut donc que ces deux espèces aient été pendant longtemps confondues.

En 2010, une étude a montré que l’espèce reconnue comme étant *P. ovale* correspond en fait à 2 espèces distinctes et sympatriques¹ : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* (39). D’autre part, la distribution géographique de ces espèces, longtemps limitée selon les auteurs à l’Afrique sub-saharienne et à certaines îles du Pacifique (40), est maintenant reconnue aussi dans différentes régions d’Asie (41–43).

Plasmodium malariae est retrouvé schématiquement dans toutes les régions concernées par le paludisme, mais de façon plus sporadique que *P. falciparum* (44). La parasitémie est généralement faible, du fait d’une propension plus importante de cette espèce à infecter les hématies âgées et d’une durée de cycle érythrocytaire d’environ 72h. Cette durée de cycle plus élevée fait de *P. malariae* un agent de fièvres quartes, qui sont généralement relativement bénignes, mais qui peuvent se compliquer d’un syndrome néphrotique, et qui surviennent en moyenne après une incubation de 16 à 59 jours (45). De plus, *P. malariae* peut persister et causer des recrudescences plusieurs dizaines d’années après l’infection (46).

Plasmodium knowlesi, parasite habituel du macaque en Asie du sud-est, est depuis peu reconnu comme cause de paludisme zoonotique chez l’Homme. Une étude publiée en 2004 révélait en effet que des cas atypiques de paludisme à *P. malariae* survenus dans une région de Bornéo s’avéraient être en fait des infections à *P. knowlesi* (47). Par la suite, il a été démontré que cette espèce était impliquée dans des infections humaines dans différentes régions du sud-est asiatique (47–49). Indifférenciable de *P. malariae* sur frottis, l’espèce a un

¹ Sympatrique, adj. : Se dit d’espèces voisines vivant dans la même région mais ne s’hybrident pas, généralement pour des motifs génétiques (Larousse).

délai d'incubation d'environ 5 jours et un cycle érythrocytaire très court de 24h (50). La parasitémie peut être élevée.

1.3.3. Cycle parasitaire et vecteur

Quelle que soit l'espèce de *Plasmodium* en cause, la transmission du paludisme se fait *via* la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles* (Culicidae), hôte définitif du parasite. Ce genre comprend 465 espèces pour la plupart incapables de transmettre la maladie. Seules 41 sont considérées comme vecteurs du paludisme (51), et en fonction de l'espèce de *Plasmodium* et de la zone géographique, les espèces vectrices ne seront pas les mêmes (**Figure 6**).

Les moustiques femelles ne sont en général fécondées qu'une seule fois, peu après avoir émergé de leur gîte larvaire, et stockent le sperme nécessaire à la fécondation de plusieurs lots d'œufs. À chacun de ces lots, il faudra un repas sanguin pour que les œufs puissent après environ 48h, arriver à maturité (cycle gonotrophique) et être pondus à la surface d'une collection d'eau (**Figure 7**) (52). C'est au cours d'un de ces repas sanguins que la femelle anophèle peut prélever des gamétocytes chez un individu contaminé. Ces formes sexuées du *Plasmodium* vont ainsi pouvoir accomplir un cycle sporogonique au sein du moustique. La fécondation a lieu dans l'estomac de l'insecte et produit un zygote mobile, l'ookinète. Celui-ci se différencie en oocyste dans l'intestin du moustique, puis l'oocyste se rompt, libérant de nombreux sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires, et pourront être injectés lors d'un prochain repas sanguin. Ce cycle extrinsèque dure en moyenne 12 jours. C'est donc la durée nécessaire pour qu'un moustique devienne infectant et capable de transmettre le paludisme après avoir ingéré un repas sanguin issu d'un individu impaludé (53).

Les sporozoïtes injectés à l'homme infectent les hépatocytes, et effectuent un cycle hépatocytaire asymptomatique d'une durée variable en fonction de l'espèce de *Plasmodium*. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, des formes hépatiques quiescentes, les hypnozoïtes, persistent et peuvent occasionner des rechutes à distance de l'accès initial. Ce cycle exo-érythrocytaire aboutit à la production de plusieurs milliers de mérozoïtes libérés dans le sang. Commence alors le cycle érythrocytaire : le parasite accomplit une multiplication asexuée et passe de trophozoïte à schizonte. Il utilise l'hémoglobine et les nutriments que

contient son hématie hôte, et la charge des toxines liées à la dégradation de l'hème. Cette hématie finira par se rompre, libérant d'une part des mérozoïtes qui iront envahir de nouveaux globules rouges, et d'autre part toutes les toxines liées au développement des *Plasmodium*. C'est la synchronisation de ces ruptures qui donnera lieu aux fièvres tierces dans le cas de *P. falciparum*, *vivax* et *ovale* (toutes les 48h), quartes avec *P. malariae* (toutes les 72h), et quotidiennes avec *P. knowlesi*.

Après quelques cycles, certaines formes érythrocytaires s'orientent vers un stade sexué et deviennent gamétocytes. Le cycle de Plasmodium est résumé sur la **Figure 8**.

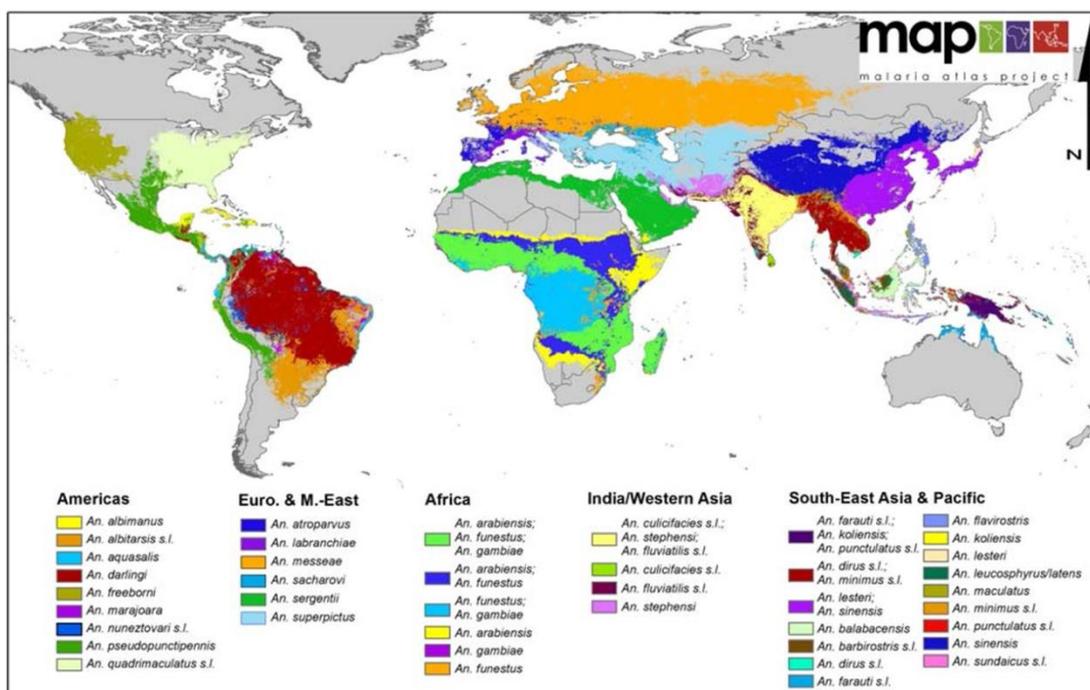


Figure 6. Distribution géographique des vecteurs du paludisme (d'après Sinka *et al.*, 2012 (51)).

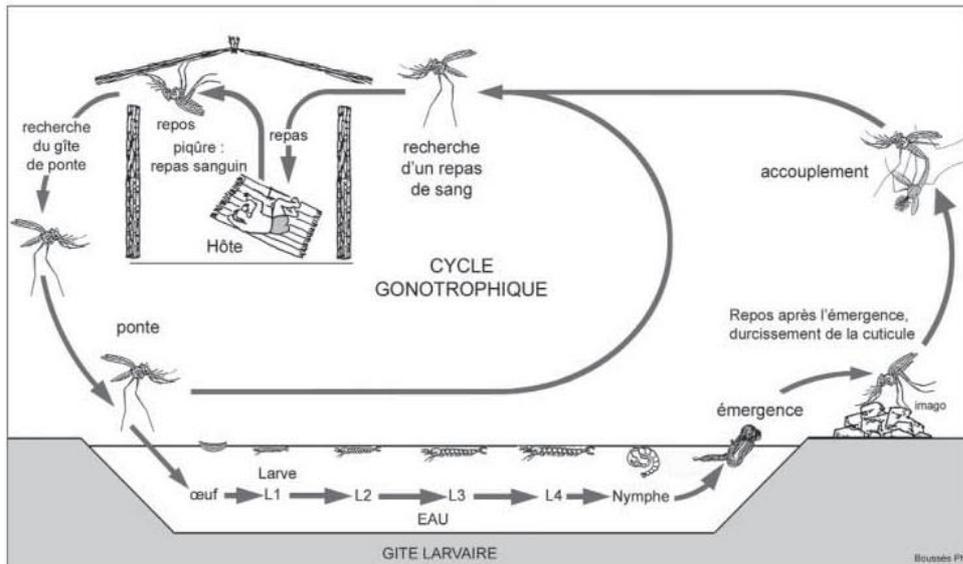


Figure 7. Cycle biologique des anophèles (d'après Carnevale et Robert, 2009 (52)).

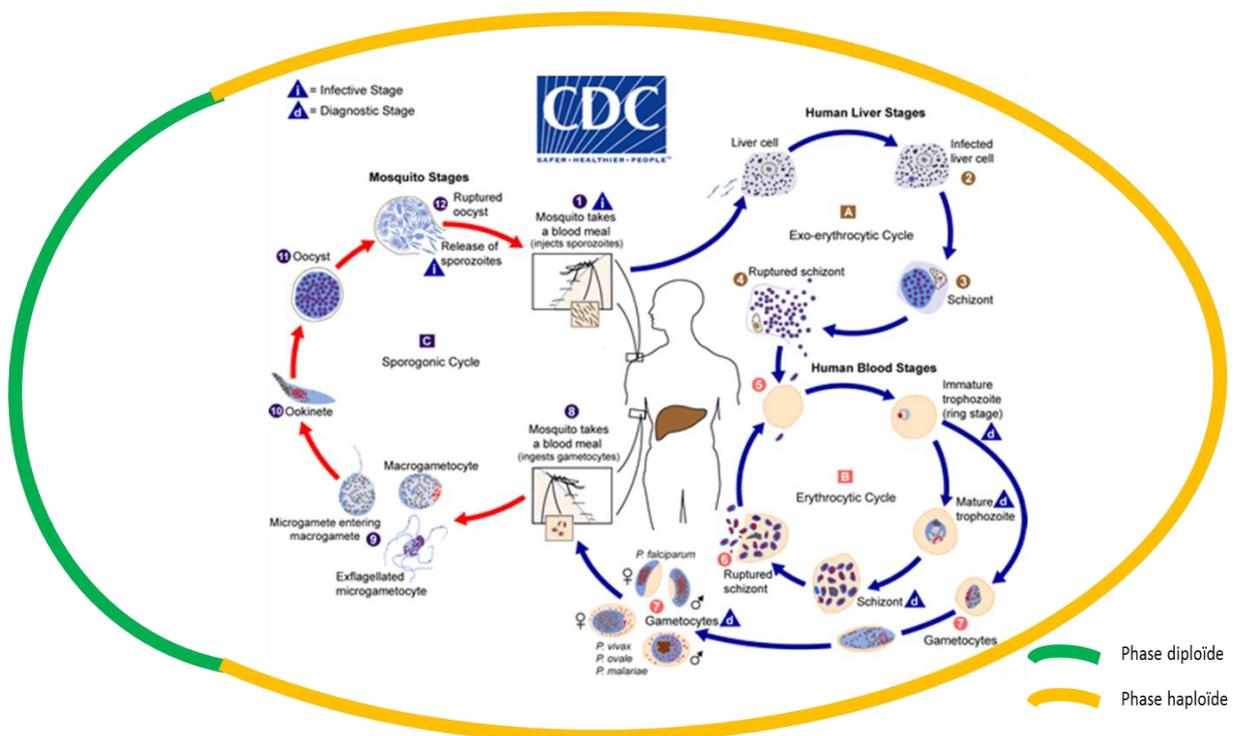


Figure 8. Cycle de *Plasmodium* (adapté du CDC)

1.3.4. Génome et vue d'ensemble du métabolisme

Les *Plasmodium* sont haploïdes une grande partie de leur cycle, et se retrouvent diploïdes uniquement chez leur hôte définitif, entre la fécondation et la formation des sporozoïtes (Figure 8).

En 2002, le génome nucléaire du clone de laboratoire 3D7 de *P. falciparum* a pu être séquencé par Gardner *et al.* (54), via une stratégie de *shotgun sequencing* sur chaque chromosome. Il comporte 23,3 Mb portées par 14 chromosomes, et est particulièrement riche en adénine et thymine (80 %). Environ 5300 gènes codant pour des protéines ont pu être dénombrés. En plus de ce génome nucléaire, *Plasmodium* est aussi doté d'un génome mitochondrial de 6 kb et d'un génome de 35 kb, propre à son apicoplaste (55).

La connaissance de la séquence complète de *P. falciparum* pose les bases de la compréhension de ses diverses voies métaboliques et de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Gardner *et al.* ont ainsi pu établir un schéma offrant une vue d'ensemble du métabolisme de *Plasmodium* (Figure 9).

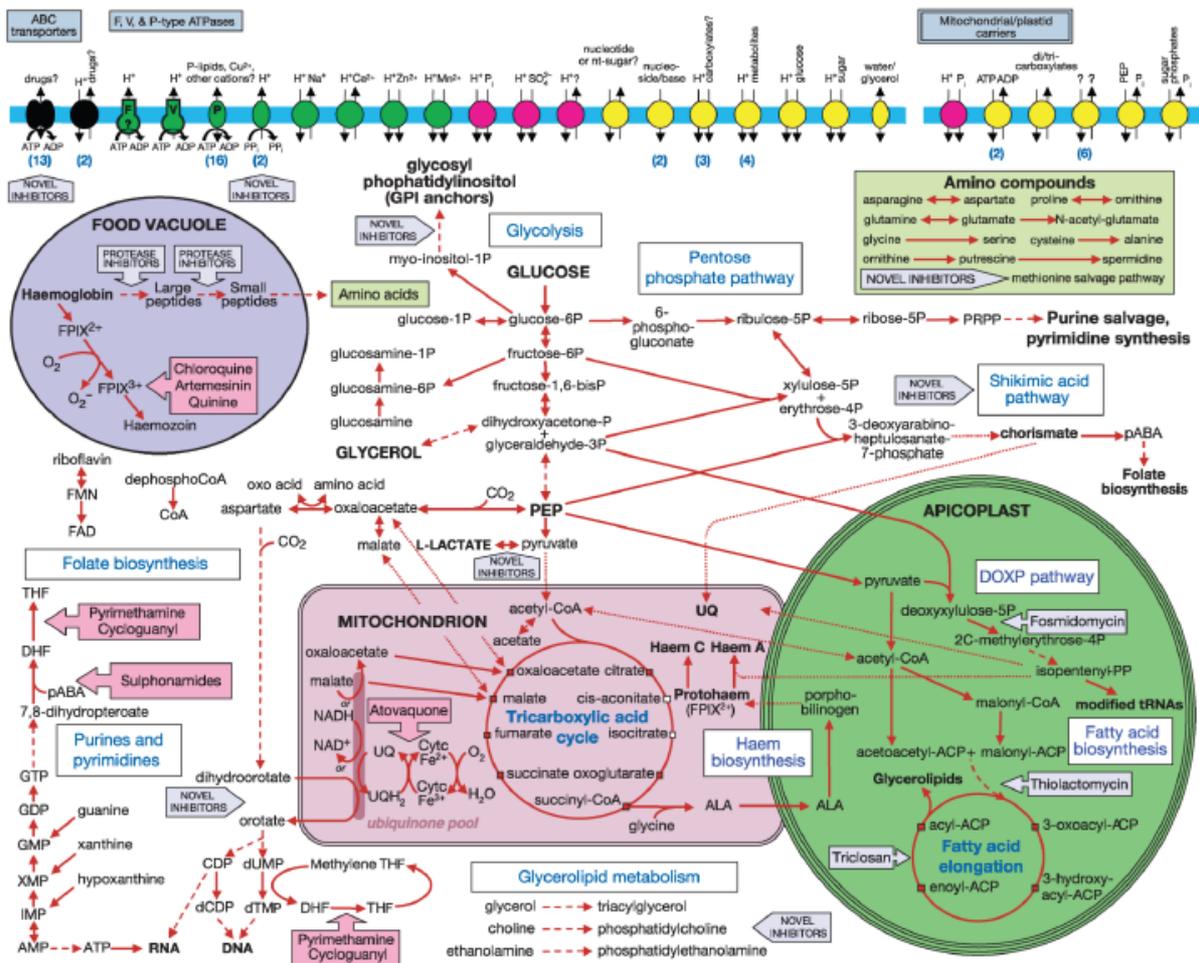


Figure 9. Vue d'ensemble des voies métaboliques de *P. falciparum* (d'après Gardner et al. (54))

1.4. Clinique et physiopathologie

La triade classique d'un accès palustre comprend fièvre, sueurs et frissons, qui surviennent de façon plus ou moins régulière, et qui correspondent à la rupture synchrone des schizontes et à la libération des déchets issus du métabolisme du parasite dont l'hémozoïne. À cette symptomatologie peuvent s'associer d'autres signes non spécifiques tels que myalgie, asthénie, céphalées ou troubles digestifs. Les accès récurrents sont responsables d'anémies potentiellement sévères, et de splénomégalies, quelle que soit l'espèce en cause.

Les formes graves sont presque exclusivement l'apanage de *P. falciparum*, qui entraîne l'expression à la surface des érythrocytes qu'il contamine, de molécules d'adhésion telles que PfEMP1. De ce fait, les hématies parasitées par des formes âgées de *P. falciparum* (schizontes) sont séquestrées au niveau des capillaires de différents organes et notamment le cerveau, pouvant entraîner la défaillance de ces organes (56). La traduction clinique peut consister en des troubles de la conscience, des convulsions, une défaillance respiratoire ou cardiovasculaire, une acidose, ou encore une insuffisance rénale. Il convient d'identifier au plus vite ces formes graves, pour mettre en place en urgence les traitements spécifiques et symptomatiques qui s'imposent alors. L'OMS a établi en 2000 la liste des critères cliniques et biologiques de gravité en zone immune, et plusieurs de ces critères sont retrouvés parmi ceux établis par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) pour définir le paludisme grave d'importation (**Tableau II**) (57).

En zone d'endémie, les infections récurrentes entraînent l'établissement progressif d'une immunité partielle, spécifique d'espèce et labile. Elle apporte une protection vis à vis des formes graves. Cela explique que les sujets les plus à risque de présenter ces formes graves soient les enfants en bas âge, n'ayant pas encore développé cette immunité, les voyageurs vivant hors zone d'endémie, et les sujets originaires de zone d'endémie expatriés en zone non impaludée et retournant dans leur pays d'origine ; ces derniers peuvent en effet avoir perdu toute immunité (58). Les femmes enceintes restent vulnérables, qu'elles vivent ou non en zone d'endémie. Les hématies parasitées s'accumulent dans les capillaires placentaires, pouvant induire des retards de croissance fœtale, des accouchements prématurés ou des avortements spontanés (59).

Pronostic	Critères cliniques et/ou biologiques	Fréquence
+++	Défaillance neurologique incluant : - obnubilation, confusion, somnolence, prostration - coma avec score de Glasgow < 11 - convulsion(s)	+++
+++	Défaillance respiratoire incluant : - si VM ou VNI : PaO ₂ /FiO ₂ < 300 mmHg - si non ventilé PaO ₂ < 60 mmHg et/ou SpO ₂ < 92% en air ambiant et/ou FR > 30/min - signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires	+
+++	Défaillance cardio-circulatoire incluant : - PAS < 80 mmHg et/ou présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire - nécessité de drogues vasopressives* et lactate > 2 mmol/l	++
++	Hémorragie : définition clinique	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l	+++
+	Anémie profonde : hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%	+
+	Hypoglycémie : glycémie < 2,2 mmol/l	+
+++	Acidose : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l, ou acidémie avec pH < 7,35 (surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/l)	++
+++	Hyperlactatémie : > 2 mmol/l (<i>a fortiori</i> si > 5 mmol/l)	++
++	Hyperparasitémie : > 4% (voir texte long)	+++
++	Insuffisance rénale : créatininémie > 265 µmol/l ou urée > 20 mmol/l	+++

VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive ; FR : fréquence respiratoire ; PAS : pression artérielle systolique

Si *Plasmodium vivax* : mêmes critères sans parasitémie > 4% (car rarement > 2%), anémie ictère fréquents, quelques cas de SDRA, rareté de l'atteinte neurologique et de l'acidose.

§ Si *Plasmodium knowlesi* : mêmes critères mais hyperparasitémie dès que > 2%, atteintes hépatique et rénale fréquentes, atteinte neurologique très rare.

*noradrénaline ou adrénaline

Tableau II. Critères de gravité du paludisme d'importation (d'après la SPILF (57))

1.5. Diagnostic biologique

Etant donné la sévérité potentielle de cette maladie et sa clinique peu spécifique, l'adage « Toute fièvre au retour de zone d'endémie est un paludisme jusqu'à preuve du contraire » est martelé aux étudiants en santé tout au long de leur cursus. Et pour affirmer le diagnostic, différentes techniques peuvent être utilisées, mais un rendu de résultat est impératif dans les 2 heures.

La classique association frottis / goutte épaisse est encore largement utilisée à travers le monde. Des techniques plus récentes s'incrémentent aussi désormais dans les logigrammes de diagnostic. Celui de la SPILF préconisé en France à l'heure actuelle, est présenté sur la **Figure 10**.

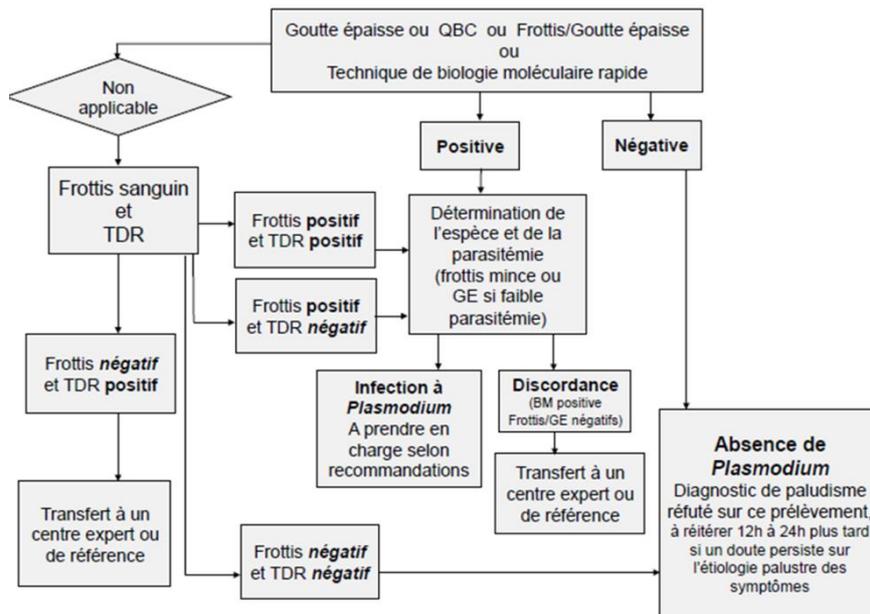


Figure 10. Logigramme du diagnostic biologique du paludisme (d'après la SPILF (57))

1.5.1. Frottis mince

L'étalement en monocouche des cellules sanguines et la coloration de celles-ci au Giemsa constitue une technique de diagnostic direct qui permet à la fois d'identifier l'espèce impliquée dans l'infection en cours par ses caractéristiques morphologiques et d'évaluer la parasitémie en déterminant le pourcentage d'hématies parasitées par des formes asexuées. D'autre part, elle est simple et peu coûteuse, mais nécessite une certaine expertise du microscopiste, et sa sensibilité est de l'ordre de 50 parasites par μl (60).

1.5.2. Goutte épaisse

Cette technique de concentration présente une bonne sensibilité de 4 parasites / μl et a l'avantage d'être peu coûteuse, mais elle est assez longue à réaliser et difficile à lire (61). Elle consiste à déposer en cercle concentrique sur une lame, une goutte d'un volume connu de sang, et à la colorer au Giemsa après une étape d'hémolyse.

Une estimation de la parasitémie est possible, mais l'identification de l'espèce est difficile. Elle est donc généralement utilisée en association au frottis mince.

1.5.3. Quantitative buffy coat

Il s'agit d'une technique de concentration commerciale utilisant un capillaire contenant de l'acridine orange, marqueur de l'ADN (Drucker Diagnostics, Port Matilda, USA). Ce capillaire est partiellement rempli du sang du patient, puis centrifugé, et une lecture au microscope à fluorescence permet ensuite de distinguer les formes parasitaires au sein de la couche érythrocytaire ou leuco-plaquettaire. Le seuil de détection est comparable à celui de la goutte épaisse (de l'ordre de 1 parasite / μl), et les compétences nécessaires à sa réalisation et sa lecture sont rapidement acquises, ce qui fait de cette technique une bonne alternative à la goutte épaisse. Elle nécessite cependant un équipement particulier, et son coût est supérieur à celui des techniques de microscopie classique. De plus, l'identification de l'espèce est complexe, et la quantification n'est pas réalisable.

1.5.4. Test de diagnostic rapide

De nombreux tests de diagnostic rapide (TDR) ont été mis sur le marché à partir des années 90 (l'OMS en a évalué 247 entre 2008 et 2015 (62)). Ils détectent les antigènes circulants de Plasmodium par immunochromatographie. Ces antigènes sont généralement la lactate déshydrogénase (LDH), l'aldolase ou l'*Histidine-rich protein 2* (HRP2) qui est spécifique de *P. falciparum*. Ce sont des techniques commerciales dont la réalisation est très simple (dépôt d'une goutte de sang et d'un tampon sur le dispositif), et qui donnent un résultat rapide, sans nécessiter d'eau ou d'électricité, ce qui permet une utilisation sur le terrain. Ces tests ont permis d'améliorer l'accès au diagnostic. Leurs performances sont variables en fonction des tests, des antigènes utilisés et des espèces recherchées. Les espèces autres que *P. falciparum* peuvent être moins bien détectées, et les parasitemies extrêmes peuvent donner lieu à de mauvaises interprétations. Il est à noter que ces tests peuvent aussi être pris à défaut lors d'infection par des souches de *P. falciparum* portant une délétion du gène *pfhrp2*. Cette mutation, sélectionnée par l'utilisation exclusive des TDR dans certaines zones d'endémie (63), est en effet retrouvée à présent dans différentes régions (64–66).

1.5.5. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont longtemps été réservées à quelques centres spécialisés du fait de leur lourdeur, de leur coût, du temps technique qu'elles demandent et de l'impossibilité de les réaliser en urgence. Elles se démocratisent désormais grâce aux avancées technologiques dans ce domaine, qui les rendent accessibles, simples d'utilisation et surtout rapides. Pour exemple, le test Illumigène® Malaria (Meridian Bioscience Inc., USA) a obtenu en 2016 le marquage CE et permet en 40 min, d'obtenir un résultat qualitatif quant à la présence d'ADN de *Plasmodium spp.*, et ce avec un seuil de détection de 0,125 à 2 parasites / μ l. Il utilise la technique d'amplification isotherme de l'ADN facilité par boucle (*Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP), et la présence de l'ADN cible est détectée par modification d'absorbance du milieu. En cas de positivité, ce test doit être complété par une technique microscopique classique pour identifier l'espèce en cause et déterminer la parasitémie.

1.5.6. Sérologie

Suite à une infection, les anticorps dirigés contre Plasmodium sont généralement produits dans les 10 à 20 jours après le début de l'accès (60), et ils persistent environ 6 mois (67). La sérologie n'est de fait, pas adaptée au diagnostic d'urgence, mais peut permettre le dépistage dans le cadre de dons de sang ou d'organe, en prévention de la transmission transfusionnelle du paludisme. Elle est aussi utilisée à visée épidémiologique, ou pour le diagnostic des formes chroniques de l'infection en zone d'endémie. Les techniques utilisées sont l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ou l'immunofluorescence.

2. Thérapeutique et prévention

Si pendant longtemps la chimiothérapie antipaludique a reposé sur l'écorce de quinquina et la quinine qu'elle contient, l'arsenal thérapeutique s'est peu à peu étoffé. Aux quinoléines, dérivés synthétiques de la quinine, sont venues s'ajouter d'autres familles de

molécules au mode d'action différent. La combinaison de différents antipaludiques est la méthode aujourd'hui utilisée pour contrer le phénomène de résistance, et les quinoléines restent ainsi au cœur du traitement antipaludique.

2.1. Principaux antipaludiques et mécanismes d'action

2.1.1. Schizonticides érythrocytaires

2.1.1.1. Dérivés quinoléiques

Les dérivés quinoléiques comprennent la quinine, traitement historique du paludisme, et ses dérivés, plus ou moins récents. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas entièrement élucidé, il semblerait qu'ils s'accumulent au sein de la vacuole digestive des *Plasmodium*, et en modifient le pH le rendant moins acide. Cette modification s'accompagne d'une incapacité du parasite à détoxifier l'hème libéré lors de la métabolisation de l'hémoglobine (68). En effet, le parasite utilise l'hémoglobine pour se procurer les acides aminés nécessaires à sa survie, et l'hème ou ferriprotoporphyrine IX (Fe(II)PPIX) alors libéré s'oxyde et devient un composé toxique pour le parasite, la Fe(III)PPIX. Pour détoxifier ce produit de dégradation, les plasmodies le transforment en hémozoïne, le pigment malarique (**Figure 11**) (69).

On distingue parmi les dérivés quinoléiques utilisés en traitement des accès palustre, les amino-4-quinoléines (chloroquine, pyronaridine, amodiaquine, pipéraquline) et les aryl-amino-alcools (quinine, quinidine, mefloquine, halofantrine et luméfantrine), qui diffèrent par leur solubilité et leur basicité. La primaquine, une amino-8-quinoléine, occupe quant à elle une place à part parmi ces molécules, du fait de son mécanisme d'action sur la chaîne respiratoire mitochondriale, et de son activité sur les hypnozoïtes (70). Elle est de fait utilisée en cure radicale pendant 14 jours pour prévenir les reviviscences après le traitement des accès palustres à *P. ovale* ou *P. vivax* (57).



Figure 11. Dégradation De l’hémoglobine opérée par *Plasmodium spp* (adapté de Misbahi (71))

2.1.1.2. Dérivés de l’artémisinine

En 1967, en plein contexte de révolution culturelle en Chine, Mao Tsé-Toung lance le programme de recherche secret nommé 523, qui vise à identifier de nouvelles molécules antipaludiques. C’est au cours de ce programme que l’intérêt du Qinghao (*Artemisia annua*) dans le traitement de la fièvre est redécouvert, et que l’artémisinine, molécule active et bientôt chef de file d’une nouvelle famille d’antipaludique, est extraite de cette plante. Cette découverte a conduit l’une de ses auteurs, Youyou Tu, au prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2015 (72).

Parmi les dérivés de l’artémisinine, on retrouve l’artésunate, l’artémether, et la dihydroartémisinine (DHA) aussi nommée arténimol. Leur mode d’action n’est pas complètement élucidé, mais il tient au pont endoperoxyde de ces composés, et à la formation de radicaux libres au sein du parasite (73). Ces molécules sont efficaces et agissent rapidement, mais sont aussi caractérisées par une demi-vie courte, qui explique leur association fréquente à des molécules dont la demi-vie est plus prolongée (amodiaquine, méfloquine, luméfantine, sulfadoxine-pyriméthamine ou pipéraquine). Ces ACT administrées *per os* sont désormais au cœur du traitement du paludisme. Elles sont prônées par l’OMS dans le traitement des accès simples, ou en relais de l’artésunate IV dans les accès graves à *P. falciparum* (74).

2.1.2. Inhibiteurs des acides nucléiques

2.1.2.1. Antifolates

Ces molécules agissent sur les voies de synthèse des folates, cofacteur de la synthèse des bases de l'ADN, en inhibant la dihydropteroate synthase (DHPS) pour les antifolates de type 1 (sulfadoxine) ou la dihydrofolate réductase (DHFR) pour les antifolates de type 2 (proguanil, pyriméthamine) (**Figure 12**). Du fait de l'émergence rapide de résistances, les antifolates sont toujours utilisés en association fixe : la sulfadoxine est utilisée avec la pyriméthamine, et le proguanil avec l'atovaquone.

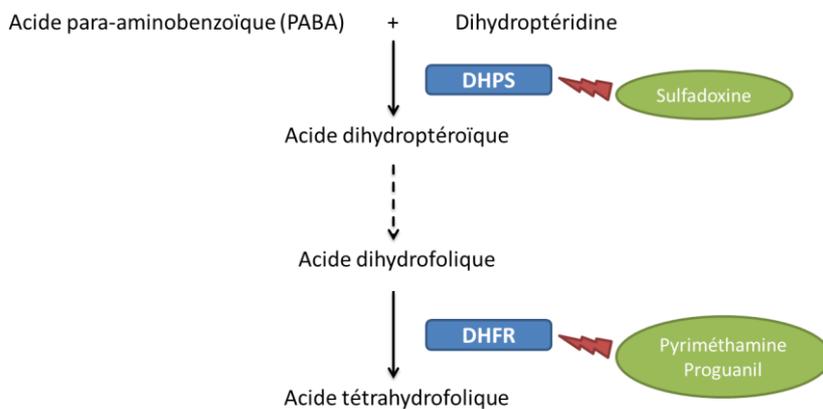


Figure 12. Voie de synthèse de l'acide folique et mécanisme d'action des antifolates.

2.1.2.2. Naphtoquinones

L'atovaquone est la seule naphtoquinone utilisée contre le paludisme. Elle agit sur le cytochrome bc1, enzyme clé de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons, et n'est utilisée qu'en association avec le proguanil. Cette association limite l'émergence de résistances, et se révèle être synergique, le proguanil interférant avec le potentiel de membrane mitochondrial (69). L'atovaquone-proguanil est utilisée à la fois à visée prophylactique et curative.

2.1.3. Antibiotiques

Les plasmodies, comme tous les apicomplexes, possèdent un apicoplaste. Cet organe correspond à un chloroplaste résiduel et est indispensable à la survie du parasite pour des raisons encore inconnues. Il possède des voies de réplication et de synthèse similaires à celles des bactéries (75). Ces éléments font de l'apicoplaste une cible privilégiée, sur laquelle des molécules déjà identifiées pour leur activité antibactérienne, peuvent agir.

Parmi ces molécules se trouvent les tétracyclines. Cette famille d'antibiotiques agit en inhibant la synthèse protéique bactérienne par liaison à la sous-unité 30S des ribosomes. De la même manière, les tétracyclines inhibent la synthèse protéique de l'apicoplaste plasmodial (76), et entraînent un effet toxique immédiat et retardé sur le parasite. S'il s'agit bien d'une propriété commune à cette famille de molécules, seule la doxycycline est utilisée dans cette indication, en chimioprophylaxie du paludisme(77).

2.2. La pipéraquine, antipaludique remis au goût du jour

Connue et synthétisée depuis les années 60, la pipéraquine a été largement utilisée pendant une vingtaine d'années en Chine, en tant que prophylaxie ou traitement curatif contre les souches résistantes à la chloroquine (78). Son usage a par la suite décliné du fait de l'émergence de résistance vis-à-vis de cette molécule alors utilisée en monothérapie. Elle a ensuite connu un regain d'intérêt avec le développement des combinaisons fixes d'antipaludiques, et est utilisée ainsi depuis les années 90 en Asie.

Avec la popularisation de l'usage des ACT par l'OMS, l'utilisation de la pipéraquine comme molécule associée s'est généralisée, et une spécialité associant 320 mg de pipéraquine et 40 mg de DHA est commercialisée en France depuis 2012 sous l'appellation commerciale Eurartesim®. Cet ACT est indiqué dans le traitement du paludisme non compliqué causé par *P. falciparum* chez les adultes et enfants à partir de 6 mois et pesant au minimum 5 kg. Les dernières recommandations de la SPILF préconisent l'usage des ACT, et donc de l'Eurartesim® ou du Riamet® (artémether + luméfantrine), seuls ACT disponibles en France, en première ligne dans le traitement des accès simple à *P. falciparum*, ainsi qu'en relais de l'artésunate IV dès amélioration dans les formes graves. Ils sont aussi en première ligne au même titre que la chloroquine lors des accès à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou

P. knowlesi. La posologie simplifiée (3 comprimés par jour en prise unique pendant 3 jours) de l'Eurartesim® en fait une spécialité de choix, malgré des modalités d'administration assez contraignantes (prise à jeun et nécessité de le rester ensuite pendant 3h). D'autre part, en raison de son effet sur la repolarisation cardiaque, il convient de pratiquer une surveillance électrocardiographique des patients traités par Eurartesim®.

La pipéraquline est une bisquinoline et contient le même noyau que les amino-4-quinoléines (**Figure 13**). Elle agirait donc par le même mécanisme non complètement élucidé, sur la voie de digestion de l'hémoglobine. Son volume de distribution est d'environ 600 L / kg, sa métabolisation est hépatique *via* les cytochromes, et sa demi-vie est de l'ordre d'une vingtaine de jours (79).

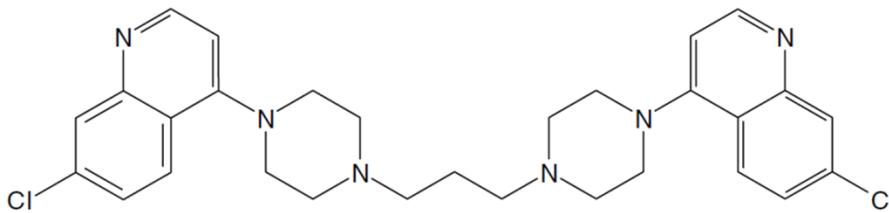


Figure 13. Structure chimique de la pipéraquline (d'après Davis *et al.* (78))

3. Résistance aux antipaludiques

La résistance aux antipaludiques est définie par l'OMS comme l'aptitude d'une souche parasitaire à survivre ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament donné à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées, mais dans les limites de tolérance du sujet. La forme active du médicament doit pouvoir accéder au parasite ou à l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale (80).

Bien que la résistance de *P. vivax* à la chloroquine soit désormais reconnue dans diverses régions du globe et ne puisse être ignorée, c'est aujourd'hui la résistance de *P. falciparum* qui inquiète le plus les acteurs de santé publique. Cette espèce a en effet développé des résistances à tous les antipaludiques successivement utilisés contre elle. Ce phénomène a déjà pu par le passé mettre à mal les programmes de lutte contre le

paludisme, et c'est un des points clés à maîtriser pour espérer pouvoir contrôler cette maladie.

3.1. Méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antipaludiques

Pour contenir les phénomènes de résistance aux antipaludiques, il est nécessaire avant tout de pouvoir identifier rapidement leur émergence, et de pouvoir suivre leur propagation. Pour cela, l'efficacité des antipaludiques sur le marché est régulièrement évaluée. Dès la mise sur le marché d'un antipaludique, un système de détection précoce de résistance est mis en place, et passe par des études d'efficacité thérapeutique *in vivo* dans les régions impaludées, ou par des tests *in vitro*, par culture ou biologie moléculaire.

3.1.1. Evaluations *in vivo* : Etudes d'efficacité thérapeutique

Les études d'efficacité thérapeutique *in vivo* consistent à suivre les patients impaludés après traitement par l'antipaludéen de référence qui est évalué. C'est la méthode de référence de la surveillance d'efficacité des antipaludiques. Ces études sont réalisées périodiquement dans différents sites sentinelles, et permettent de déterminer et de suivre l'évolution de l'efficacité clinique d'une molécule dans une population donnée. Leur conception est entièrement standardisée dans un protocole rédigé par l'OMS, détaillant les critères d'inclusion et d'exclusion, la taille des échantillons ou encore la durée nécessaire de suivi (81). La réponse au traitement administré est évaluée en fonction de la clinique et de la parasitémie à différents moments au cours du suivi, et elle est catégorisée en échec thérapeutique précoce, échec clinique tardif, échec parasitologique tardif ou réponse clinique et parasitologique adéquate. Cette standardisation permet une meilleure comparabilité des différentes études, mais des facteurs pharmacocinétiques, nutritionnels ou immunitaires peuvent en biaiser les résultats et doivent être considérés (82).

3.1.2. Evaluations *in vitro*

L'évaluation de sensibilité aux antipaludiques *ex vivo* (directement à partir de l'isolat du patient) ou *in vitro* (après adaptation de l'isolat clinique en culture) consiste à tester en

laboratoire les isolats cliniques quant à leur niveau de sensibilité aux antipaludiques (83). Cette méthode est complémentaire de l'évaluation *in vivo*, et permet de déterminer la sensibilité intrinsèque des isolats cliniques, en s'affranchissant des facteurs liés à l'hôte et des éventuels biais d'ordre pharmacocinétique (84). De plus, il est possible par cette méthode de tester différents antipaludiques à la fois sur un même isolat, et ainsi d'évaluer les résistances croisées ou la multi-résistance.

Les protocoles d'évaluation de sensibilité *in vitro* ne sont pas standardisés, mais ils s'appuient sur la culture continue de *P. falciparum*, développée par Trager et Jensen en 1976 (85) : *P. falciparum* peut accomplir son cycle érythrocytaire *in vitro*, en présence d'hématies et de sérum humains, d'un milieu de culture adapté, et en atmosphère contrôlée à 37 °C et pauvre en oxygène. La sensibilité d'isolats de *P. falciparum* peut ainsi être testée par culture de 24 à 72h en présence de concentrations croissantes de l'antipaludique choisi. La croissance parasitaire est estimée à l'issue de la culture, et les courbes représentant la croissance parasitaire en fonction de la concentration en antipaludique peuvent être établies, et permettent de déterminer la concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀), concentration à laquelle la croissance est inhibée de 50 % (**Figure 14**).

Différentes méthodes de détection peuvent être utilisées pour estimer la croissance parasitaire, parmi lesquelles :

- La microscopie : la méthode de détection la plus simple consiste à déterminer par microscopie la parasitémie sur frottis sanguins après coloration. Cette méthode demande peu d'équipement et est peu coûteuse, mais elle est laborieuse et manque de précision.
- La méthode isotopique : il est possible d'ajouter de l'hypoxanthine tritiée dans les milieux de culture, et de détecter à l'issue de la culture, la radioactivité émanant des parasites vivants, puisqu'ils incorporent cette hypoxanthine radioactive à leur ADN (86). Cette méthode demande moins de temps que la microscopie, mais nécessite un équipement spécialisé adapté à l'utilisation d'isotopes radiomarqués.
- Le dosage immuno-enzymatique de protéines spécifiques de *P. falciparum* : après culture, la concentration en protéine pLDH ou pHRP2 peut être mesurée par *double-site enzyme-linked LDH immunodetection* (DELI) et ELISA respectivement. Ces concentrations sont corrélées à la croissance parasitaire, ce qui permet leur utilisation pour les tests de sensibilités (87,88). Ces techniques présentent l'avantage

d'être automatisables et relativement simples à mettre en place, et nécessitent moins d'équipement que les techniques isotopiques, mais elles peuvent rester coûteuses du fait des prix des trousseaux commerciales ou des anticorps spécifiques.

- La fluorescence : le SYBR Green, marqueur fluorescent capable de se fixer à l'ADN, peut être utilisé pour détecter et quantifier les parasites. En effet, les hématies ne disposent généralement pas d'ADN, contrairement aux parasites. La fluorescence obtenue est donc corrélée à la parasitémie. Smilkstein *et al.* décrivent ainsi par exemple en 2004, une technique simple et peu coûteuse sur la base de ce principe (89).

Ces tests de chimiosensibilité sont réservés à quelques laboratoires spécialisés du fait de l'équipement et de l'expérience qu'ils demandent de la part des opérateurs. De plus, ils sont longs, onéreux, et nécessitent des parasites vivants, et donc une transmission rapide au laboratoire capable de les traiter (82).

Ces tests sont représentatifs de l'efficacité des antipaludiques *in vivo* pour la plupart des molécules. Pour l'artémisinine et ses dérivés en revanche, aucune corrélation n'a pu être trouvée entre clairance parasitaire *in vivo* et profil de sensibilité déterminé *in vitro* par les tests précédemment cités : les isolats provenant de patients en échec thérapeutique par dérivé de l'artémisinine ne présentent pas d'augmentation de leur CI_{50} (90,91). En 2012, Witkowski *et al.* ont donc développé un test de survie des trophozoïtes jeunes (Ring-stage survival assay, RSA) au cours duquel les trophozoïtes issus de cultures synchronisées (*in vitro*) ou directement de patients (*ex vivo*), sont exposés à 700 nM de DHA pendant 6h. Le taux de survie est ensuite évalué par microscopie (91). Ce test phénotypique s'avère être corrélé à la clairance parasitaire déterminée *in vivo* (92).

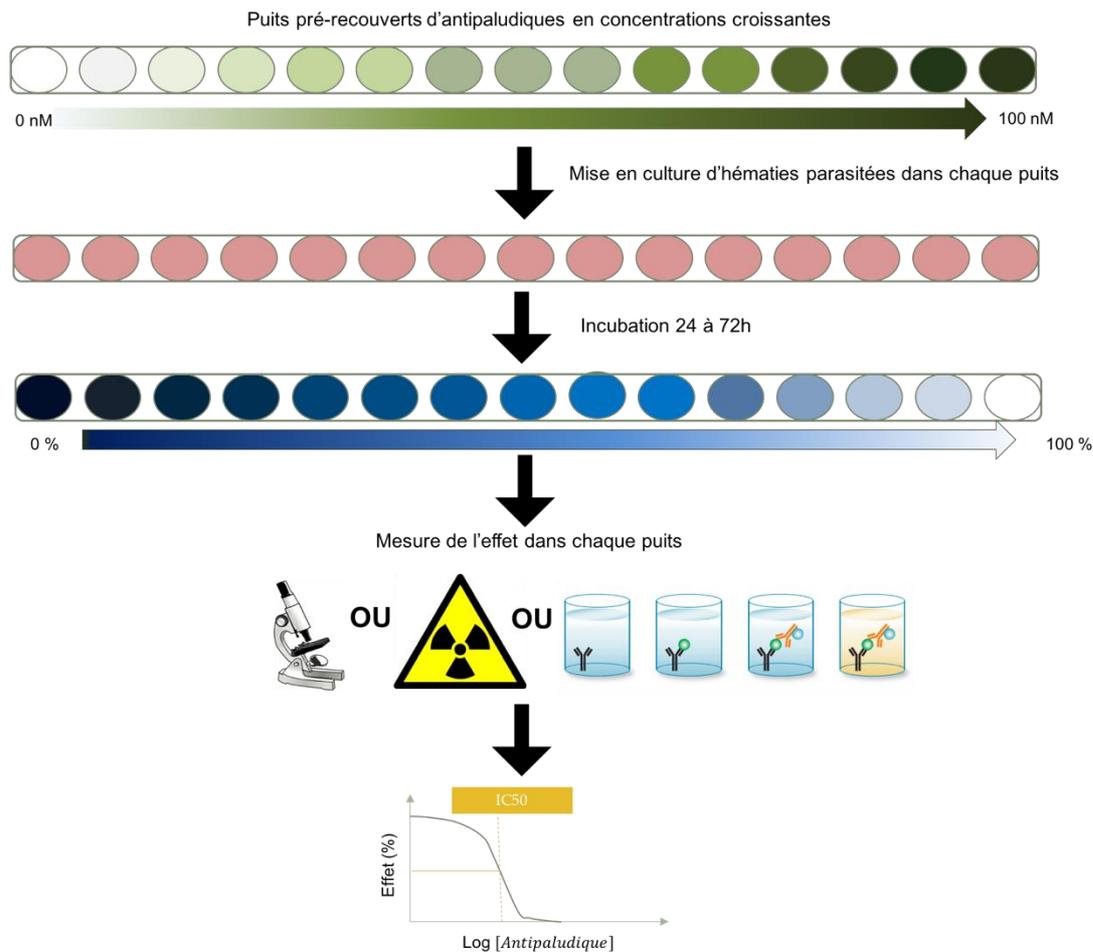


Figure 14 : Principe de l'évaluation in vitro de la sensibilité aux antipaludiques.

3.1.3. Les marqueurs moléculaires et leurs méthodes d'identification

Le phénomène de résistance à un antipaludique est lié à une ou des modifications intervenues sur le génome de *Plasmodium*. Lorsque ces modifications sont identifiées, elles constituent des marqueurs moléculaires de résistance, et leur recherche sur les souches cliniques permet de connaître la sensibilité de ces souches vis à vis de l'antipaludique. Différentes méthodes de biologie moléculaire peuvent être utilisées pour les rechercher, par exemple la PCR suivie d'un séquençage, la PCR en temps réel ou le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (83). Ces techniques sont adaptées à l'étude simultanée de plusieurs isolats, et sont moins laborieuses et moins coûteuses que l'évaluation de résistance *in vivo* ou *in vitro* par culture. L'essor de la biologie moléculaire fait de ces marqueurs des moyens simples et peu coûteux

de suivre l'émergence et la propagation de résistance. Ils constituent aussi des pistes pour comprendre les mécanismes d'actions des antipaludiques, et pour contrer la résistance.

Au préalable, il est nécessaire de faire le lien entre un phénotype de résistance à un ou plusieurs antipaludiques, et une mutation. Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour établir ces liens.

3.1.3.1. Cartographie des liaisons

La stratégie de cartographie des liaisons peut être utilisée pour l'identification de marqueurs moléculaires de résistance. Elle consiste à croiser un clone A résistant vis-à-vis d'un antipaludique, avec un clone B sensible, et de soumettre les descendants haploïdes issus de ce croisement à une pression par l'antipaludique auquel A est résistant. Seuls les descendants résistants ayant hérité de la mutation portée par A sont ainsi sélectionnés. Ils sont ensuite étudiés par biologie moléculaire : différents marqueurs génétiques répartis sur tout le génome sont évalués pour identifier le clone parental dont ils proviennent. L'origine de ces marqueurs est normalement répartie de façon égale entre clone A et B sur l'ensemble du génome. Au niveau des *loci* impliqués dans la résistance à l'antipaludique par contre, les descendant sélectionnés ne seront porteurs que des allèles du parent A, puisqu'ils sont, comme lui, résistants à l'antipaludique (93,94) (**Figure 15**).

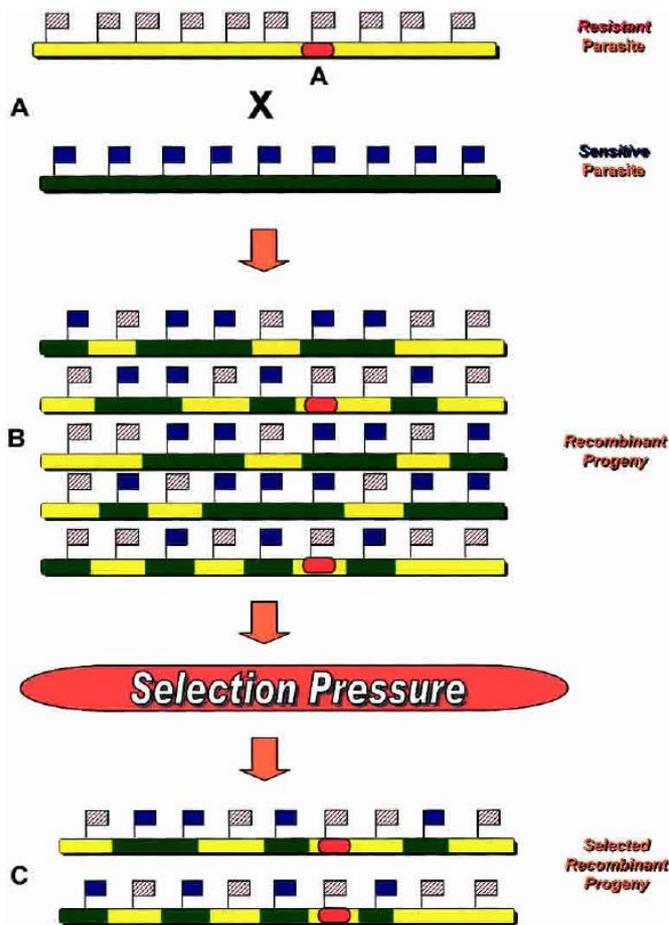


Figure 15 : Principe de la cartographie de liaison (d'après Culleton *et al.* (93)).

3.1.3.2. Etude d'association génétique : gènes candidats et études d'association pangénomique

Certains gènes peuvent être considérés d'emblée comme gènes candidats, du fait de leur implication dans des voies métaboliques identifiées en rapport avec le mode d'action de l'antipaludique, ou d'un lien déjà établi avec la résistance d'autres molécules. Des études d'association génotype-phénotype peuvent dans ce cas être menées pour affirmer ou infirmer l'association de mutations sur ces gènes candidats avec la résistance à un antipaludique en particulier. Concrètement, il s'agit de rechercher la présence de ces mutations sur des isolats cliniques, et d'établir une corrélation entre leur présence et la résistance *in vitro* ou *in vivo* à un antipaludique.

L'étude d'association pangénomique (Genome-wide association studies, GWAS) quant à elle, consiste à analyser l'association statistique entre des marqueurs génétiques répartis sur tout le génome, et des traits phénotypiques parasitaires (95). Il s'agit de comparer la fréquence de variants génétiques entre parasites issus d'échantillons cliniques dont la réponse au traitement est variable. La fréquence plus importante d'un marqueur dans la population résistante n'implique pas forcément que ce marqueur est responsable de la résistance, mais peut indiquer qu'il est en déséquilibre de liaison avec la mutation en cause, c'est-à-dire que leurs distributions sont liées (96). Cette approche permet d'étudier tout le génome, sans poser d'hypothèses préalables quant à d'éventuels gènes candidats.

3.1.3.3. Culture sous pression

Cette méthode consiste à sélectionner *in vitro* des clones résistants à un antipaludique, en appliquant sur un clone initialement sensible, une pression par cet antipaludique. Différentes approches sont possibles, de l'augmentation croissante de concentration en antipaludique administré en continue, à l'application unique d'une concentration importante. L'objectif est le même : obtenir des parasites résistants, et comparer leur séquence génomique à celle du clone initial (97). Plusieurs mutations peuvent être retrouvées, et toutes ne sont pas forcément liées à la résistance. L'obtention de plusieurs clones résistants peut permettre d'identifier les mutations présentant le plus d'intérêt. En effet, si plusieurs clones présentent des mutations au niveau d'un même gène, celui-ci pourra être considéré comme gène candidat. Cette stratégie permet à la fois de disposer de clones résistants et stables en culture, et de détecter des marqueurs et mécanismes de résistance parfois avant même leur apparition sur le terrain.

3.2. Etat des lieux de la résistance aux antipaludiques

3.2.1. Les leçons de l'Histoire et la situation actuelle

Les antipaludiques de synthèse ont commencé à faire leur apparition après la seconde guerre mondiale. Parmi eux, la chloroquine s'est avéré être abordable, efficace et sûre à dose thérapeutique. En 1955, armée de ce traitement et du

dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un nouvel insecticide actif sur le vecteur, l'assemblée mondiale de la santé lance une ambitieuse campagne d'éradication du paludisme. Elle aboutira à l'élimination de la maladie en Europe, en Amérique du Nord, et dans différentes régions d'Amérique latine et d'Asie. Mais malgré ces succès, ce programme a dû prendre fin avant d'atteindre ces objectifs en 1969, à cause notamment de l'apparition de résistances à la fois des anophèles au DDT et des parasites à la chloroquine (98).

En effet, en 1957, les premiers cas de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine sont rapportés en Asie du Sud-est. Peu après, en 1959, cette résistance est décrite aussi en Amérique du sud (99). De l'Asie, elle s'est répandue aux zones de forte endémie palustre et notamment à l'Afrique où les premiers cas ont été décrits dès les années 70 (100) (**Figure 16**). Cela a eu un impact considérable sur la santé publique sur ce continent, où une recrudescence de la mortalité a alors été observée (101).

Pour contrer la résistance à la chloroquine, différents antipaludiques ont par la suite été déployés. Chacun d'eux ou presque a malheureusement connu le même destin. Après une période d'utilisation plus ou moins courte, des souches de *P. falciparum* de sensibilité diminuée à l'une ou l'autre de ces molécules ont en effet commencé à apparaître (**Figure 17**). Les autorités de santé ont tenté de répondre à cette menace en promouvant les associations fixes d'antipaludiques notamment à base d'artémisinine, car ces dérivés entraînent une clairance parasitaire importante et rapide. Les ACT, en associant un dérivé de l'artémisinine très efficace mais d'une demi-vie d'à peine quelques heures, et un autre antipaludique éliminé plus lentement, permettent d'augmenter l'efficacité du traitement tout en réduisant la durée et en limitant l'émergence de résistances (99). L'OMS fait de ces combinaisons en 2001, une alternative de choix aux monothérapies antipaludiques dans le traitement des accès simples à *P. falciparum* dans les zones où des résistances à ces monothérapies sont décrites (74). Devant l'efficacité de cette recommandation sur la mortalité, elle sera généralisée au monde entier en 2006 (102).

Les ACT sont ainsi devenus la clé de voûte du traitement antipaludique. L'émergence de résistance à ces combinaisons constitue donc une menace sérieuse pour le contrôle de la maladie. Or, dès 2008, les premiers cas de clairances parasitaires retardées sous dérivés de l'artémisinine sont décrits d'abord au Cambodge (90,103), puis dans différentes régions du sud-est asiatique (104–106). Depuis, il a aussi été fait état de diminutions d'efficacité de l'association artésunate – méfloquine (107,108). Plus récemment, la combinaison DHA –

PPQ a été à son tour mise en défaut peu de temps après son introduction sur le marché : une étude réalisée entre 2008 et 2010 montre en effet une augmentation des échecs thérapeutiques dans certaines provinces cambodgiennes (3). Cela a été confirmé par d'autres études, qui ont aussi montré que ces échecs sont dus à une résistance à la fois à la DHA et à la PPQ (4,109,110).

En l'absence d'alternative thérapeutique adaptée, la diffusion de la résistance aux ACT pourrait avoir des conséquences dramatiques, comme a pu le montrer l'histoire de la résistance à la chloroquine. Il est donc essentiel de maîtriser ces phénomènes de résistance, et pour cela, d'en connaître les déterminants.

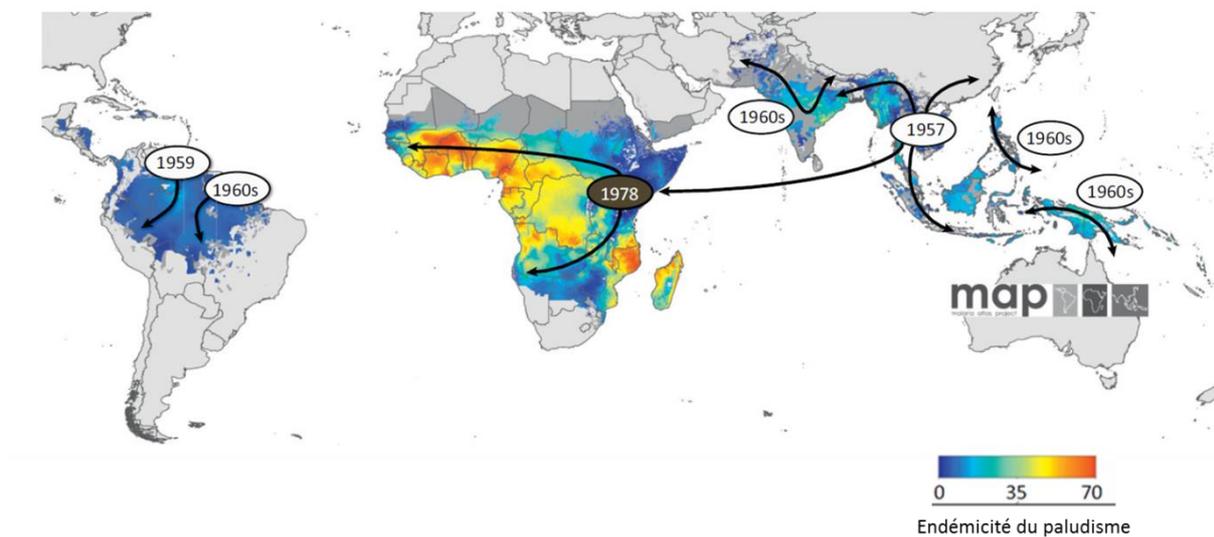


Figure 16 : Apparition et propagation de la résistance à la chloroquine (d'après Ecker et al, 2012 (111)).

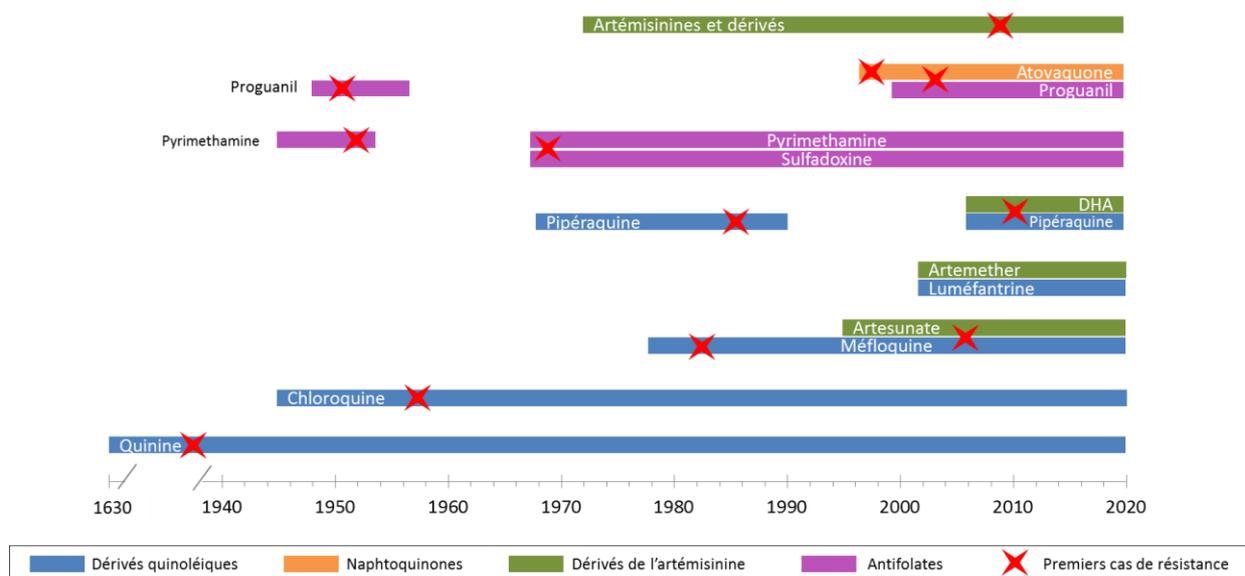


Figure 17 : Introduction des antipaludiques et apparition des résistances (82,112–115).

3.2.2. Modalités d'apparition

La chloroquine en 1957, la sulfadoxine – pyriméthamine dans les années 70, la méfloquine au début des années 80, les premières résistances à ces molécules sont toutes apparues dans le sud-est asiatique, puis se sont propagées à d'autres régions impaludées. Aujourd'hui à nouveau, c'est dans cette région du monde qu'apparaît la résistance aux ACT. Si la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge est l'épicentre de toutes les résistances, c'est parce qu'elle réunit toutes les conditions pour que ces résistances puissent s'établir, et ensuite se propager.

Le génome de *Plasmodium* subit continuellement des mutations au cours de ses phases de réplication de l'ADN. Au hasard de ces modifications, des mutations conférant une résistance à un antipaludique peuvent survenir, et conférer un avantage à la souche qui la porte lorsque celle-ci est soumise à une pression médicamenteuse. La pression antipaludique n'induit donc pas l'apparition de mutations, mais provoque la sélection des clones portant des mutations de résistance (95,116).

L'Asie du sud-est est une région de faible transmission du paludisme. De ce fait, l'immunité y est moins importante, ce qui permet des parasitémies plus élevées, et donc plus de possibilité de voir se développer une mutation conférant une résistance, et plus de chance pour ce mutant de survivre sans être éliminé par le système immunitaire de l'hôte. Les mutations entraînant des résistances peuvent entraîner un coût d'adaptation et être

délétères pour les parasites qui les portent. En zone de forte endémicité, les individus sont généralement atteints par plusieurs souches génétiquement différentes en même temps, et une compétition s'opère entre les différentes souches. En zone de faible endémicité, cette diversité est beaucoup moins importante, et la compétition pour la survie à l'intérieur de l'hôte est donc moins grande. Cela laisse toutes ses chances au clone muté de s'établir. Il aura ensuite tout le temps de réduire son coût d'adaptation par des mutations compensatrices. D'autre part, l'immunité réduite fait qu'une infection a plus de risque d'être symptomatique et donc traitée dans les régions de faible endémicité, laissant ainsi la possibilité à une sélection de s'opérer (117). Ajoutons à cela les défauts d'observance, les antipaludiques contrefaits ne permettant pas d'obtenir des taux thérapeutiques, et des mouvements de population favorisant la propagation, et se trouvent alors réunies toutes les conditions pour faire du sud-est asiatique le berceau de toutes les résistances.

3.2.3. Marqueurs de résistance identifiés

Des marqueurs moléculaires ont pu être identifiés pour différents antipaludiques. Ce sont généralement des mutations ou des variations du nombre de copies d'un gène. Pour certains de ces marqueurs, l'association avec la résistance à un antipaludique n'en est encore qu'au stade d'hypothèse. Pour d'autres, cette association est déjà validée et utilisée pour suivre la distribution de la résistance, et parfois, ils ont même permis de comprendre le mécanisme de résistance. Certains de ces marqueurs sont décrits ci-dessous, ainsi que dans le **Tableau III**:

- *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*): Ce gène porté par le chromosome 7 code pour une protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive. Son rôle central dans la résistance à la chloroquine a initialement été identifié par cartographie de liaison (118), puis la mutation p.Lys76Thr, souvent associée à un ensemble de mutations sur ce même gène, a clairement été corrélée à la résistance à la chloroquine dans différentes études sur des isolats cliniques notamment (119,120). Le mécanisme de cette résistance passe par une augmentation de l'export de la chloroquine hors de la vacuole digestive où elle est sensée agir (121).

- *P. falciparum* multidrug resistance protein 1 (*Pfmdr1*): *Pfmdr1* (chromosome 5) code une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Ce

transporteur est impliqué dans la résistance à différents antipaludiques. Une augmentation du nombre de copies de ce gène conduisant à une surexpression du transporteur est associée en Asie à la résistance à la méfloquine, la luméfántrine ou la quinine (122–124). La mutation p.Asn86Tyr est quant à elle associée à la résistance à l'amodiaquine (125).

- *P. falciparum* multidrug resistance-associated protein 1 (*Pfmrp1*) : Le gène *Pfmrp1* code lui aussi pour un transporteur ABC. Les mutations sur ce gène ont été associées à la multirésistance aux antipaludiques. Sont concernées la chloroquine, la quinine ou encore la sulfadoxine-pyriméthamine (126,127).

- *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (*Pfdhfr*) : Cible des antifolates de type 2, la protéine DHFR peut être mutée, entraînant la résistance à ces antifolates. Les mutations p.Ser108Asn, p.Asn51Ile et p.Cys59Arg sont notamment mises en cause (128).

- *P. falciparum* hydroxymethyl–dihydropterin pyrophosphokinase–dihydropteroate synthase (*Pfdhps*) : Différentes mutations de leur cible sont aussi en cause dans la résistance aux antifolates de type 1 (129).

- *P. falciparum* cytochrome b (*Pfcytb*) : Cible de l'atovaquone, le cytochrome bc1 est une enzyme mitochondriale impliquée dans la chaîne respiratoire de cet organite. Les mutations au niveau du codon 268 ont été associées à la résistance à l'atovaquone par culture sous pression (130), et sur des isolats cliniques (131).

- *P. falciparum* sodium–hydrogen exchanger (*Pfnhe*) : *pfnhe* code pour un échangeur Na^+/H^+ de la membrane plasmique. Des répétitions de motifs (DNNND ou NHNDNHNNDDD) ont été associées à la résistance à la quinine par cartographie de liaison ou retrouvées sur des isolats cliniques résistants in vitro à la quinine (132,133).

- *P. falciparum* kelch (*pfk13*) : La mise en évidence du lien entre mutation au sein du domaine en hélice de la protéine Kelch 13 et résistance aux dérivés de l'artémisinine est l'exemple type de mise en évidence de marqueurs moléculaires. Peu après la description de l'émergence de résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du sud-est, des GWAS ont été menées et ont identifié une région située sur le chromosome 13 comme étant impliquée dans la résistance (134,135). Une culture sous pression menée pendant 5 années consécutives par l'Institut Pasteur a permis de faire émerger un clone résistant à l'artémisinine. La comparaison du génome de celui-ci avec celui d'un contrôle cultivé sans artémisinine et du clone de laboratoire 3D7 (sensible à l'artémisinine) a mis en évidence des

mutations du domaine en hélice de la protéine K13 (située justement sur le chromosome 13). La présence de mutations de ce gène a ensuite été retrouvée sur des isolats cliniques provenant des provinces concernées par la résistance, et des mutations, et notamment la p.C580Y, ont pu être associées à une moins bonne clairance parasitaire sous dérivé de l'artémisinine (136). Les expériences d'édition du génome ont ensuite permis de valider l'implication de mutations de K13 dans la résistance à l'artémisinine : Staimer *et al.* ont utilisé les nucléases à doigt de zinc pour modifier artificiellement la séquence de K13 d'isolats cliniques et ont observé une diminution des taux de survie lorsque les mutations impliquées étaient ôtées du génome de souches résistantes, et une augmentation des taux de survie de souches sauvages lorsque des mutations étaient ajoutées artificiellement à la séquence de K13 (137). Ghorbal *et al.* ont eux utilisé l'outil CRISPR-Cas9 pour introduire la mutation p.C580Y de K13 à partir de souches sauvages et ont observé une augmentation de la survie de ces souches (138). Ce marqueur moléculaire n'est pour l'heure pas retrouvé en Afrique, où les rares mutations identifiées sur K13 ne semblent pas avoir d'impact sur la sensibilité aux dérivés de l'artémisinine (139).

- *P. falciparum plasmepsin 2 (Pfpm2)*: Ce gène code pour une protéase intervenant dans la dégradation de l'hémoglobine (140). En 2016, deux GWAS réalisés par des équipes différentes ont mis en évidence l'implication de l'augmentation du nombre de copies des gènes *plasmepsin 2* et *plasmepsin 3* dans la résistance d'isolats sud-asiatiques à la pipéraquline (5,6). Par la suite, Mukherjee *et al.* ont montré que l'inactivation de ces gènes sur un clone 3D7 conduisait à une hypersensibilité à la pipéraquline (141). Il s'agit donc d'un marqueur prometteur. Son implication dans la résistance à la pipéraquline ailleurs qu'en Asie reste cependant à prouver. Bien que la présence de duplications du gène *Pfpm2* ait été retrouvée sur 1,1% des isolats cliniques d'une étude menée au Mozambique, le lien avec une résistance de ces isolats à la pipéraquline n'a pas été établi (142). D'autre part, il semblerait que ce gène n'explique pas à lui seul toute la résistance à la pipéraquline. En effet, Russo *et al.* ont récemment décrit un cas d'échec thérapeutique à l'association DHA-PPQ qui n'est expliqué ni par des mutations de *PfK13*, ni par une duplication de *Pfpm2* (143). De plus, dans une autre étude menée sur des isolats provenant du Cambodge, l'augmentation du nombre de copies des gènes *Pfpm2* et *Pfpm3* n'a pas été retrouvée sur tous les isolats résistants (144).

- *P. falciparum* cyclic amine resistance locus (*Pfcarl*) : Ce gène code pour une protéine impliquée dans le trafic intracellulaire. La recherche de nouveaux antipaludiques a récemment mené à la découverte de nouvelles classes chimiques de molécules efficaces contre *Plasmodium*, et notamment les imidazolopipérazine et les benzimidazolyl piperidine qui sont actuellement en cours de développement (145). Au cours de l'étude de ces composés, des expériences de culture sous pression ont été menées et ont montré l'apparition rapide de résistances, et des mutations au niveau du gène *Pfcarl* en cause dans la résistance à ces 2 classes de molécules (146,147). Se pose alors la question de savoir si ce gène, déjà mis en cause dans la résistance à 2 familles de molécules, n'est pas impliqué dans la résistance à des antipaludiques actuellement sur le marché, et notamment à la pipéraquline.

- *P. falciparum* Prodrug Activation and Resistance Esterase (*Pfpare*) : *Pfpare* code pour une esterase impliquée dans l'activation de promédicaments (148). La culture sous pression par pepstatine dont l'efficacité antipaludique vient tout juste d'être montrée, entraîne l'apparition rapide de clones résistants mutés au niveau de *Pfpare*. L'introduction artificielle de ces mutations dans un clone sauvage a prouvé l'implication de ce gène dans la résistance. L'impact de ces mutations sur la sensibilité à d'autres molécules reste à établir.

Antipaludique	Marqueur de résistance	
	Gène	Allèle associé à la résistance
Quinine	<i>pf_{nhe-1}</i>	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDDD < 3
	<i>pf_{mrp}</i>	His191Tyr Ser437Ala
Chloroquine	<i>pf_{crt}</i>	Lys76Thr
	<i>pf_{mrp}</i>	Ser437Ala His191Tyr
Amodiaquine	<i>pf_{mdr1}</i>	Asn86Tyr
	<i>pf_{mrp}</i>	Ser437Ala His191Tyr et Ser437Ala
Méfloquine	<i>pf_{mdr1}</i>	Nombre de copies > 1
Luméfantrine	<i>pf_{mdr1}</i>	Nombre de copies > 1
Sulfadoxine-Pyriméthamine	<i>pf_{dhfr}</i>	Ser108Asn
	<i>pf_{dhps}</i>	Ala437Gly
	<i>pf_{mrp}</i>	Lys1466Arg
Proguanil	<i>pf_{dhfr}</i>	Ser108Thr + Ala16Val Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg
Atovaquone	<i>pf_{cytb}</i>	Tyr268Asn
		Tyr268Ser
Doxycycline	<i>pf_{tetQ}</i>	Nombre de motif KYNNNN < 3
	<i>pf_{mdt}</i>	Nombre de copies > 1
Dérivés de l'artémisinine	<i>P/K13</i>	C580Y
		F446I
		Y493H

Tableau III. Marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* par antipaludiques (adapté de Pradines *et al.* (82)).

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. Objectifs de l'étude et stratégie expérimentale

Le paludisme reste aujourd'hui encore un problème de santé publique majeur. L'OMS recommande à l'heure actuelle les combinaisons à base d'artémisinine dans le traitement des accès simples de paludisme à *P. falciparum*, et notamment la DHA – PPQ, mais des résistances à ces deux molécules ont émergé dans le sud-est asiatique. Pour contenir ces résistances, il est nécessaire de pouvoir rapidement les identifier et de pouvoir suivre leur propagation. Les marqueurs moléculaires sont des outils permettant de faciliter la surveillance des résistances. Un marqueur moléculaire de résistance aux dérivés de l'artémisinine a récemment pu être mis en évidence pour des résistances en Asie mais ne semble pas prédictif des résistances aux dérivés de l'artémisinine en Afrique. Pour ce qui est de la résistance à la pipéraquline, l'augmentation du nombre de copies du gène *Pfpm2* a bien été identifiée comme marqueur, mais n'est corrélée à la résistance qu'en Asie du sud-est. Son implication reste encore à démontrer en Afrique. D'autre part, deux nouveaux marqueurs, *Pfpare* et *Pfcarl*, ont été impliqués dans la résistance à de nouveaux antipaludiques en cours de développement. Leur implication dans la résistance à d'autres antipaludiques, et notamment à la pipéraquline, n'a pas été évaluée.

Cette étude a pour objectif de valider et d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la diminution de sensibilité à la pipéraquline.

Deux axes ont été abordés :

- La validation des gènes candidats *Pfpm2*, *Pfpare* et *Pfcarl* sur des isolats africains de *P. falciparum* par une étude d'association phénotype-génotype (**Figure 18**).
- La recherche de nouveaux marqueurs *via* la mise en place d'un protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline en vue d'induire des résistances à cette molécule à partir d'un clone de laboratoire initialement sensible.

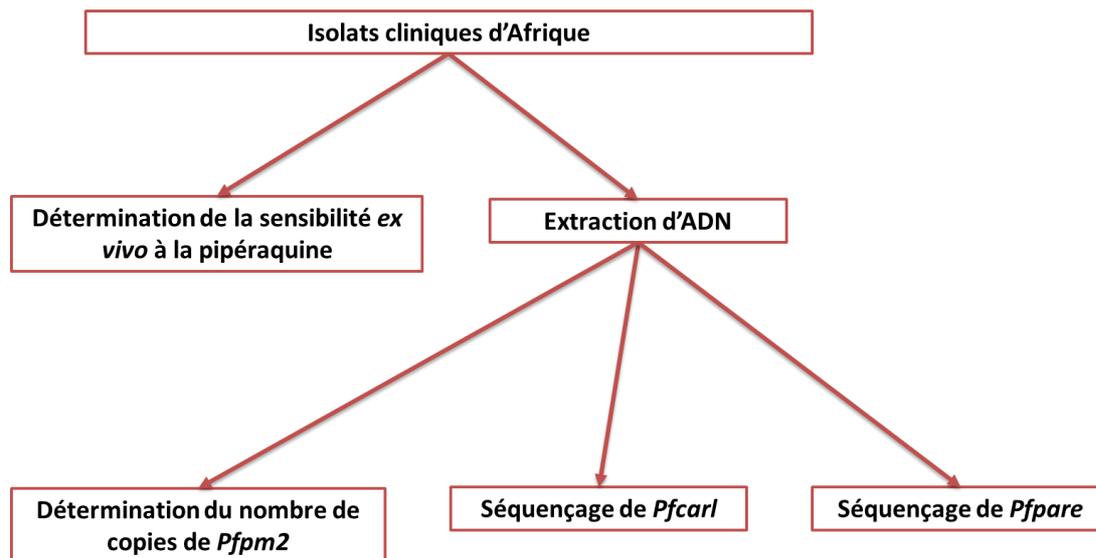


Figure 18. Résumé de la stratégie expérimentale utilisée pour la validation des candidats marqueurs Pfp2, Pfcarl et Pfp2

2. Matériels et méthodes

2.1. Isolats de *P. falciparum*

L'étude de validation des marqueurs moléculaires *Pfp2*, *Pfcarl* et *Pfp2* a porté sur 86 isolats de *Plasmodium falciparum* issus de patients de l'Hôpital principal de Dakar (Sénégal) collectés entre 2013 et 2016 et transmis à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) dans le cadre d'une collaboration pour une surveillance des résistances dans cette région, ainsi que 291 isolats issus de patients hospitalisés en France pour un paludisme d'importation acquis en Afrique (Benin, Burkina Faso, Burundi, Cameroun, République Centrafricaine, Comores, Congo, Côte d'Ivoire, Djibouti, Gabon, Ghana, Guinée, Madagascar, Mali, Mozambique, Niger, Nigéria, Ouganda, Rwanda, Sénégal, Tanzanie, Tchad, Togo) collectés entre 2015 et 2017 et adressés au Centre National de Référence (CNR) du paludisme de Marseille (**Figure 19**). Les prélèvements de sang veineux ont été effectués avant traitement. La mono-infection par *P. falciparum* a été confirmée par frottis sanguin coloré au RAL[®] (Réactifs RAL, Paris, France) et par PCR (LightCycler 2.0, Roche Group, Suisse) comme décrit précédemment (149).

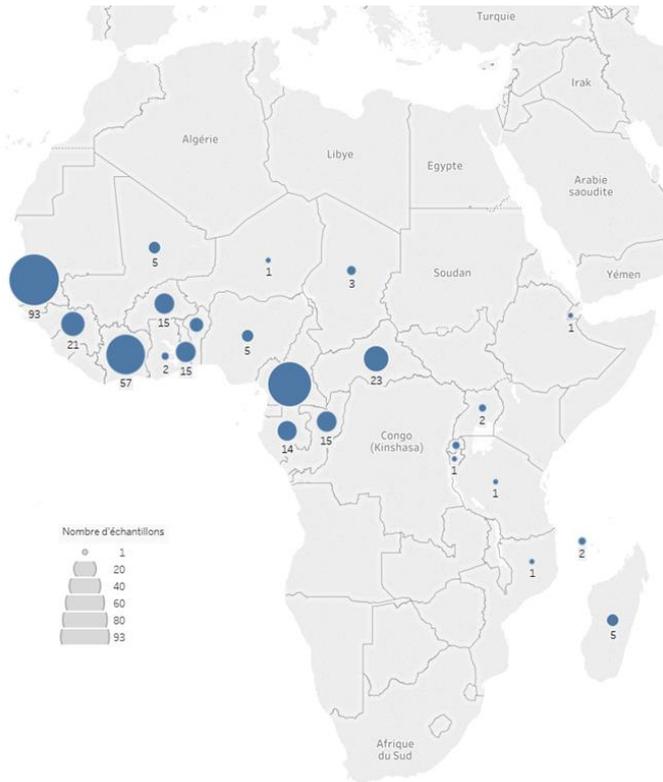


Figure 19. Origine géographique des isolats de l'étude.

2.2. Détermination de la sensibilité ex vivo à la pipéraquline

Seize puits ont été préparés avec des concentrations croissantes de pipéraquline (Shin Poong Pharm Co., Séoul, Corée du sud) lyophilisée. Cent microlitres d'hématies parasitées par l'isolat à tester (parasitémie finale à 0,5% ; hémocrite finale à 1.5%) ont été déposés dans chaque puits avant incubation à 37°C sous 5% de CO₂ et 10% d'O₂ pendant 72h. Au terme de cette incubation, les plaques ont été congelées à -20°C. Après une étape de congélation-décongélation permettant la lyse des hématies, la quantité de protéines HRP2 dans chaque puits a été déterminée par un test ELISA suivant les recommandations du fabricant (KM2159; Cellabs PTY Ltd., Brookvale, Australie). La densité optique (DO) dans chaque puits a été mesurée par spectrophotométrie (Safire 2, Tecan, France). La concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) a été estimée à l'aide du logiciel en ligne ICEstimator version 1.2 (<http://www.antimalarial-icestimator.net>) (150). La valeur de la CI₅₀ n'a été validée que si le ratio des DO (DO à une concentration nulle en pipéraquline / DO à la concentration maximale) était supérieur à 1,6. La diminution de sensibilité à la pipéraquline est définie avec cette technique par une CI₅₀ supérieure à 135 nM (151).

2.3. Extraction d'ADN

Les ADN des isolats de *P. falciparum* ont été extraits à l'aide du kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), à partir de 200 µL de culot globulaire, en suivant les recommandations du fabricant.

2.4. PCR quantitative sur gène *Plasmepsin 2* (qPCR)

Dans leur publication mettant en avant l'association entre augmentation du nombre de copies du gène *Pfpm2* (PF3D7_1408000) et résistance à la pipéraquline (6), Witkowski *et al.* déterminent le nombre de copies de ce gène par PCR quantitative avec détection des amplicons par un agent intercalant de l'ADN (SYBR green). La détection à l'aide de sondes d'hydrolyse fluorescentes a été préférée ici. Bien que plus coûteuse, cette méthode est en effet plus spécifique (152).

Le nombre de copies du gène *Pfpm2* a donc été déterminé par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan®, sur Lightcycler® 2.0 (Roche, Allemagne). Les amorces et la sonde *Pfpm2* (**Tableau IV**) ont été sélectionnées à l'aide du logiciel en ligne PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest>) (153). Les réactions d'amplification ont été réalisées en capillaires (LightCycler® Capillaries 20 µl, Roche, Allemagne). La composition des mélanges réactionnels de PCR est indiquée dans le **Tableau V**. Le programme de PCR comportait 45 cycles d'amplification (15 s à 95°C puis 1 min à 60°C). Les résultats ont été analysés par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (le Ct étant la valeur du cycle correspondant au signal seuil, le *cycle threshold*). La quantité relative du gène cible (*Pfpm2*) normalisée par un gène de ménage présent à hauteur d'une copie chez toutes les souches (β -tubulin), a été déterminée par rapport à un calibrant, comme décrit précédemment (122). L'ADN du clone de laboratoire de *P. falciparum* 3D7, qui possède une seule copie du gène *Pfpm2*, a été utilisé comme calibrant.

Le nombre de copies du gène de la Plasmepsin 2 (N) pour chaque échantillon est ainsi obtenu par la formule suivante :

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

avec

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{Pfp2} - Ct_{\beta tubulin}]_{\text{échantillon}} - [Ct_{Pfp2} - Ct_{\beta tubulin}]_{3D7}$$

Pour que la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ soit applicable, l'efficacité de la PCR doit être similaire pour le gène cible et le gène référence. Cette hypothèse a préalablement été vérifiée en amplifiant les fragments de *Pfp2* et *β-tubulin* à partir de différentes dilutions d'ADN du clone 3D7 et en calculant le ΔCt pour chaque concentration ($\Delta Ct = Ct_{Pfp2} - Ct_{\beta tubulin}$). Un coefficient directeur de la droite $\Delta Ct = f[\log(\text{dilution d'ADN})]$ proche de zéro signe une efficacité similaire des PCR *Pfp2* et *β-tubulin* (**Figure 20**). Le coefficient directeur de la droite obtenue ici était de 0,03.

Un témoin négatif par mélange réactionnel (*Pfp2* et *β-tubulin*) était inclus dans chaque série. Les échantillons ont été testés en duplicat et contrôlés si l'écart-type entre les deux valeurs de Ct obtenues dépassait 0,5 ou si le résultat en nombre de copies était supérieur à 1,5. Un résultat en nombre de copies > 1,6 était défini comme une amplification du gène.

Un témoin positif collecté chez un patient en échec clinique à l'association DHA-PPQ revenant du Cambodge et contenant 2 copies de *Pfp2* a été inclus pour valider cette PCR quantitative (échantillon fourni par le Pr. Houzé).

<i>Pfp2</i>	F	5' – GGA GAT AAC CAA CAA CCA TTT AC – 3'
	R	5' – GTTGTACATTTAACACTTGGA – 3'
	Sonde	5' – FAM-CCCATAAATTAGCAGATCCTGTATC-TAMRA – 3'
<i>β-tubulin</i>	F	5' – TGA TGT GCG CAA GTG ATC C – 3'
	R	5' – TCC TTT GTG GAC ATT CTT CCT C – 3'
	Sonde	5' – FAM-TAG CAC ATG CCG TTA AAT ATC TTC CAT GTC T-TAMRA – 3'

Tableau IV. Liste des amorces et sondes utilisées pour la quantification du nombre de copies du gène *Pfp2*.

Réactifs	Concentration
LightCycler® TaqMan® Master	1X
Amorce F	900 nmol/L
Amorce R	900 nmol/L
Sonde	250 nmol/L
Matrice ADN	3 µL

Tableau V. Composition des mélanges réactionnels utilisés pour la détermination du nombre de copies du gène *Pfpm2*.

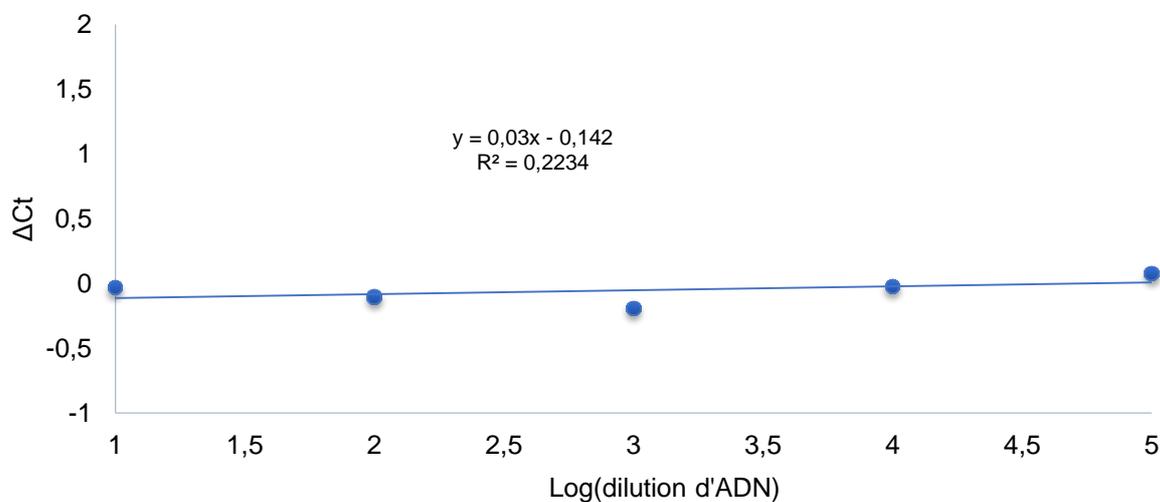


Figure 20. Validation de la méthode des $\Delta\Delta C_t$: $\Delta C_t = f[\log(\text{dilution d'ADN})]$. Un coefficient directeur proche de zéro indique une efficacité similaire des PCR *Pfpm2* et *β -tubulin*. $\Delta C_t = C_{t_{Pfpm2}} - C_{t_{\beta\text{-tubulin}}}$.

2.5. Séquençage Sanger des gènes *Pfpare* et *Pfcarl*

Un fragment de 829 nucléotides du gène *Pfpare* (PF3D7_0709700) et un fragment de 821 nucléotides du gène *Pfcarl* (PF3D7_0321900) ont été amplifiés avec les amorces *Pfpare* F et *Pfpare* R, et *Pfcarl* F et *Pfcarl* R respectivement, sélectionnées à l'aide du logiciel en ligne Primer3plus et listées dans le **Tableau VI** (154). La composition des mélanges réactionnels de PCR est indiquée Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Les programmes d'amplification opérés sur thermocycleur (LifeEco, BIOER, Chine) pour chaque gène, sont indiqués **Tableau VIII** et **Tableau IX**. Le séquençage a été réalisé avec les amorces *Pfcarl* F pour le gène *Pfcarl*, et *Pfpare* F ainsi que *Pfpare* S pour le gène *Pfpare*, à l'aide du séquenceur ABI Prism (version

1.1; Applied Biosystems, CA) et de la trousse BigDye Terminator (Applied Biosystems, CA), en suivant les instructions du fournisseur.

<i>Pfcarl</i> F	5' TTG-CCA-TGA-TTT-GAA-GTA-CA 3'
<i>Pfcarl</i> R	5' AAC-CAT-TTT-CGT-ATT-CAT-GTT 3'
<i>Pfpare</i> F	5' AAA-ATA-GTT-GGA-TTG-AGG-AG 3'
<i>Pfpare</i> R	5' ACT-TGT-TCT-TCT-TGT-TTG-G 3'
<i>Pfpare</i> S	5' ACT-TGT-TCT-TCT-TGT-TTG-G 3'

Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes *Pfcarl* et *Pfpare*.

Réactifs	Concentration finale
10X PCR Buffer	1X
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP	0,2 mM
Forward	0,32 µM
Reverse	0,32 µM
Polymerase Red Diamond Taq	1 U
Matrice ADN	4 µL

Tableau VII. Composition des mélanges réactionnels d'amplification des fragments des gènes *Pfcarl* et *Pfpare*.

Cycle	Température	Temps	Nb. de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	10 min	1
Dénaturation	95 °C	30 s	40
Hybridation	50 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation finale	72 °C	10 min	1

Tableau VIII. Programme d'amplification du gène *Pfcarl*.

Cycle	Température	Temps	Nb. de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	10 min	1
Dénaturation	95 °C	30 s	40
Hybridation	52 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation finale	72 °C	10 min	1

Tableau IX. Programme d'amplification du gène *Pfpare*.

2.6. Culture sous pression discontinue de pipéraquline

2.6.1. Souche, parasitémie et conditions de culture

L'un des paramètres clés pour la réussite d'une culture de *P. falciparum* sous pression sélective, est le choix du clone initial (155). En effet, la capacité à générer un clone résistant varie d'un clone à l'autre. Certains, comme le clone de laboratoire W2 (Indochine) (156), sont plus enclins à développer des résistances sous pression (157), et ce du fait d'un taux de mutations plus important. Ce phénomène est appelé ARMD (*Accelerated resistant to multidrug*). C'est donc ce clone qui a été choisi pour ce protocole de culture sous pression de pipéraquline. Sa chimiosensibilité à la pipéraquline a été préalablement déterminée par la méthode décrite ci-dessus et la CI_{50} initiale était de 52,6 nM. La CI_{90} initiale était de 496,19 nM.

Par ailleurs, la parasitémie à l'initiation d'une pression est un critère déterminant dans ce type de protocole. Plus elle est élevée et plus les chances de générer un clone résistant augmentent (158,159). En culture *in vitro*, la croissance parasitaire est cependant limitée si la parasitémie est trop élevée. Un compromis a donc été trouvé, et la parasitémie à l'initiation des pressions exercées dans ce protocole, était située entre 4,5 et 6 %, soit $2,5 \cdot 10^8$ à $3 \cdot 10^8$ parasites par flasque.

Les cultures parasitaires ont été réalisées en flasques de 50 mL, sur hématies humaines de groupe A⁺ fournies par l'Établissement français du sang (EFS) et diluées à 9 % d'hématocrite, soit 500 µL d'hématies et 5 mL de milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) supplémenté à 10 % en sérum humain (EFS). Elles ont été maintenues en culture continue à 37°C sous atmosphère à 5 % de CO₂ et 10 % d'O₂ par la méthode de Trager et Jensen (85). La surveillance de la parasitémie par frottis ainsi que le changement de milieu étaient réalisés quotidiennement sur chaque flasque.

2.6.2. Détermination de la concentration initiale de pipéraquline à utiliser et de la durée des pressions

Afin d'identifier la concentration initiale de pipéraquline à utiliser pour initier une pression discontinue, ainsi que la durée de la pression à appliquer, plusieurs flasques ont été réalisées pour tester 5 concentrations initiales appliquées pendant 24h (50, 100, 150, 200 et 300 nM soit respectivement environ 1, 2, 3, 4 et 6 fois la Cl₅₀ du clone initiale), puis 2 concentrations appliquées pendant 48h (150 et 200 nM). Un cycle d'exposition à la pipéraquline se composait dans les flasques tests, d'une exposition à la pipéraquline de 24h ou 48h avec remplacement du milieu et de la pipéraquline après 24h, suivie du remplacement du milieu par un milieu sans pipéraquline et supplémenté à 10 % en sérum humain, jusqu'à ce que la parasitémie atteigne à nouveau 4,5 à 6 %. Une nouvelle pression était alors appliquée. Le clone W2 était cultivé en parallèle sans pipéraquline, comme contrôle, et maintenu à une parasitémie de 1 à 5 % à l'aide d'hématies de groupe A⁺ (EFS).

2.6.3. Déroulement des cycles de pression

Les cultures parasitaires sous pression de pipéraquline ont été réalisées en triplicat. Trois flasques contenant le clone W2 ont été placées sous pression discontinue de pipéraquline et le clone W2 était cultivé en parallèle sans pipéraquline dans une quatrième flasque comme contrôle. Un cycle de pression par pipéraquline se composait d'une exposition à la pipéraquline pendant 48h, puis d'un lavage avec du milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies), et d'une levée de pression à 48h, et ce jusqu'à ce que la parasitémie atteigne à nouveau 4,5 à 6%. Une nouvelle pression était alors appliquée, à la même

concentration si le retour à une parasitémie de 4,5 à 6 % s'effectuait en plus de 3 jours, et à une concentration augmentée si le retour à une parasitémie de 4,5 à 6 % s'effectuait en 3 jours ou moins. L'augmentation de concentration s'opérait par paliers de 50 ou 150 nM. Un congelât de la souche à -150°C à l'aide de glycérolyte était réalisé à chaque fois que la proportion de trophozoïtes jeunes dans la flasque était supérieure à 65%, et idéalement après deux augmentations de pression en pipéraquline (160). La détermination de la chimiosensibilité à la pipéraquline dans chaque flasque était réalisée par la méthode décrite ci-dessus.

3. Résultats

3.1. Quantification du nombre de copies du gène *Plasmepsin 2*

Au total, 234 isolats ont été analysés avec succès à la fois en termes de chimiosensibilité vis à vis de la pipéraquline et sur le plan de leur nombre de copies du gène *Pfpm2*. Parmi ces isolats, les CI_{50} à la pipéraquline étaient comprises entre 0,94 et 241,90 nM, avec une moyenne de 40,95 nM (**Figure 21**). Cinq isolats présentaient une sensibilité diminuée à la pipéraquline, avec des CI_{50} allant de 137,5 à 241,9 nM.

Aucun des isolats étudiés ne présentait d'augmentation du nombre de copies du gène *Plasmepsin 2* (**Figure 22**). La valeur maximale obtenue pour N était en effet de 1,51. Les nombres de copies moyens entre le groupe des isolats résistants et celui des isolats sensibles n'était pas significativement différent (respectivement 0,94 et 1,02 ; $p = 0,36$). La différence entre les nombres de copies moyens restait statistiquement non significative en considérant tous les isolats de sensibilité diminuée à la pipéraquline ($\text{CI}_{50} > 90$ nM) par rapport aux isolats de $\text{CI}_{50} < 90$ nM (respectivement 0,93 et 1,02 ; $p = 0,06$). La résistance *in vitro* à la pipéraquline n'est donc pas associée à une augmentation du nombre de copies du gène *Pfpm2* pour ces isolats africains.

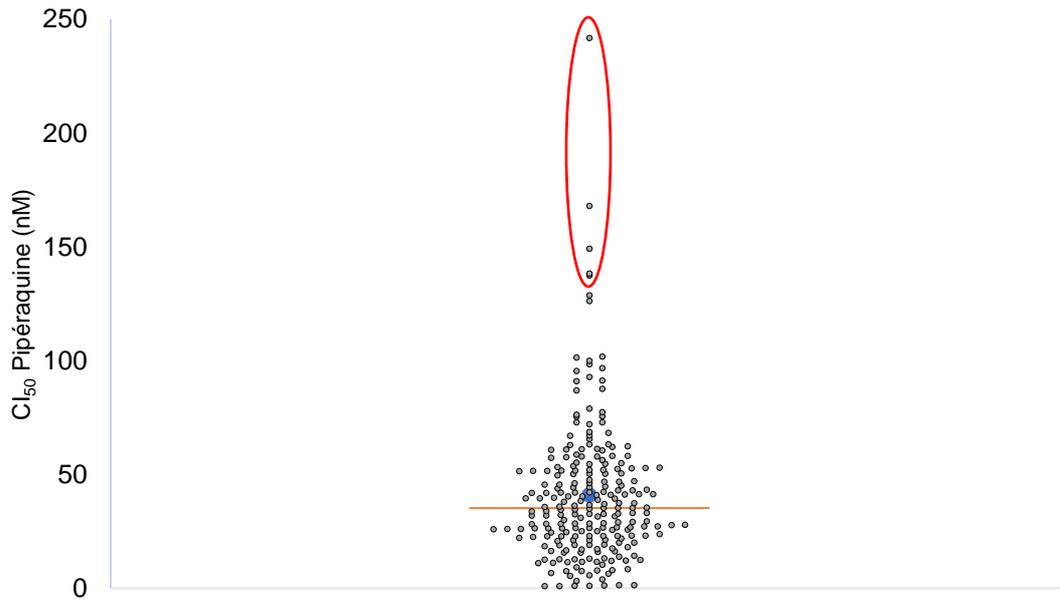


Figure 21. Distribution des Cl_{50} à la pipéraquline des isolats analysés en termes de nombre de copies du gène *Pfpm2*. La droite rouge représente la Cl_{50} moyenne. Les points correspondants aux isolats résistants à la pipéraquline sont entourés en rouge.

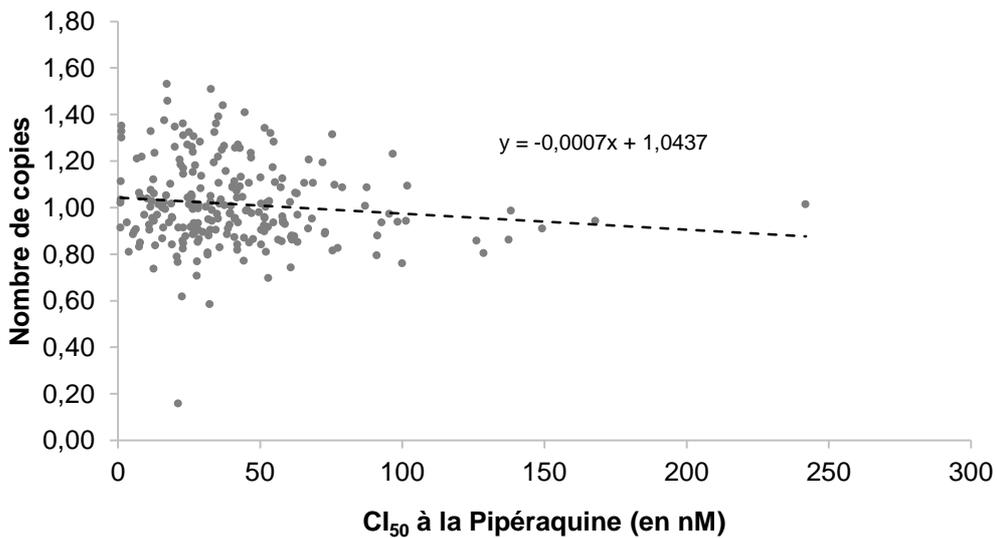


Figure 22. Nombre de copies du gène *Pfpm2* en fonction de l' IC_{50} à la pipéraquline. La ligne en pointillé représente la droite de régression linéaire.

Ce travail a été valorisé sous la forme d'une publication acceptée dans *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* pour les isolats collectés dans le cadre du CNR (**Annexe 1**) (161). Une autre

publication sur les isolats collectés au Sénégal est en cours de soumission dans *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* (**Annexe 2**).

3.2. Recherche de mutations sur *Pfpare* et *Pfcarl*

Le séquençage des gènes *Pfpare* et *Pfcarl* a été effectué avec succès pour respectivement 279 et 257 isolats de *P. falciparum*. Aucun des isolats ne présentait les mutations décrites sur *Pfpare* comme associées à la résistance à la pepstatin butyl ester (p.Q139X, p.H304Y, p.L323H, p.G345V, p.W356C ou p.L357P) (148). Cependant, deux autres SNPs ont été retrouvés sur ce gène parmi nos isolats : p.M261I et p.K322R (**Tableau X**) présents chez 87,1 et 3,6 % des isolats respectivement. Ces SNPs avaient déjà été retrouvés parmi les souches séquencées sur la ressource en ligne PlasmoDB (<http://PlasmoDB.org>) (162), contrairement aux mutations associées à la diminution de sensibilité aux antipaludiques selon Istvan et al (148). Les sensibilités moyennes à la pipéraquline dans les groupes présentant ou non les mutations p.M261I ou p.K322R, ne sont pas significativement différentes (**Tableau XI**).

Concernant le séquençage du gène *Pfcarl*, là encore, aucun des isolats ne présentait les mutations p.P822L, p.L830V et p.L833I, décrites comme associées à la résistance aux antipaludiques (146). Trois autres SNP ont été retrouvés sur nos isolats : p.K784N, non référencé sur PlasmoDB et présent chez un seul isolat sensible à la pipéraquline, p.K734M, retrouvé chez 7,92 % des isolats, et p.K903E, dont tous nos isolats étaient porteurs (**Tableau XII**). La sensibilité moyenne à la pipéraquline ne différait pas entre le groupe présentant p.K734M et le groupe sauvage (**Tableau XI**).

Une publication synthétisant les données obtenues sur *Pfcarl* est en cours de préparation (titre prévisionnel : *Low polymorphisms level in pfact, pfugt and pfcarl genes in African Plasmodium falciparum isolates and absence of association with susceptibility to common anti-malarial drugs*).

Mutations	Associées à la résistance (148)						Retrouvées sur les isolats de l'étude	
	Q139X	H304Y	L323H	G345V	W356C	L357P	M261I	K322R
Pourcentage des isolats de l'étude présentant la mutation	0	0	0	0	0	0	87,1	3,6
Pourcentage des souches séquencées sur PlasmoDB présentant la mutation	0	0	0	0	0	0	98	6

Tableau X. Représentation des SNPs sur *Pfpare* décrits comme associés à la multirésistance et des SNPs retrouvés dans ce projet parmi nos isolats.

Gène	Mutation	Moyenne des IC ₅₀ à la pipéraquline dans le groupe muté	Moyenne des IC ₅₀ à la pipéraquline dans le groupe non muté	p
<i>Pfpare</i>	p.M261I	34,23	32,98	0,21
	p.K322R	33,57	32,57	0,54
<i>Pfcarl</i>	p.K734M	35,20	37,10	0,98

Tableau XI. Comparaison des valeurs de CI₅₀ moyennes entre les échantillons porteurs d'allèles mutants et d'allèles sauvages.

Mutations	Associées à la résistance			Retrouvées sur les isolats de l'étude		
	P822L	L830V	L833I	K784N	K734M	K903E
Pourcentage des isolats de l'étude présentant la mutation	0	0	0	0,4	7,92	100
Pourcentage des souches séquencées sur PlasmoDB présentant la mutation	0	0	0	0	11	99

Tableau XII. Représentation des SNPs sur *Pfcarl* décrits comme associés à la multirésistance et des SNPs retrouvés dans ce projet parmi nos isolats.

3.3. Détermination de la concentration initiale de pipéraquline à utiliser et de la durée des pressions

L'effet d'une pression de pipéraquline pendant 24h a d'abord été testé afin d'identifier le moment où l'effet observé est à son maximum, et de cibler la concentration à utiliser pour notre protocole. Les concentrations entraînant un effet trop marqué ainsi que celles entraînant une réduction de parasitémie trop modeste et n'étant donc pas suffisamment efficace pour effectuer une sélection, ont ainsi pu être d'emblée éliminées. Les ratios des parasitémies à 24, 48 et 72h de l'initiation de la pression (respectivement P_{24} , P_{48} , P_{72}) sur la parasitémie initiale P_0 (**Figure 23**), permettent de décrire le comportement des souches dans les heures qui suivent une pression. Jusqu'à 200 nM, l'effet d'une pression appliquée pendant 24h est le plus important à 48h post exposition à la pipéraquline, puis on observe une remontée de la parasitémie à 72h. La pression par 300 nM pendant 24h a entraîné une diminution de la parasitémie en dessous du seuil de sensibilité du frottis et après 12 jours de culture sans pipéraquline, aucun parasite n'a pu être observé. Cette concentration est donc trop importante pour initier une sélection puisqu'elle élimine la totalité de la population après seulement 24h d'exposition. La baisse de la parasitémie à 48h est limitée après pression de 24h par 50 et 100 nM de pipéraquline, avec des ratios P_{48}/P_0 qui restent supérieurs à 0,5 (0,833 et 0,565 respectivement).

L'étude de l'effet d'une pression de 48h s'est donc focalisée sur les concentrations de 150 et de 200 nM. Les ratios des parasitémies à 24, 48, 72, 96 et 120h de l'initiation de la pression sur la parasitémie initiale (**Figure 24**), confirment qu'une pression de 48h entraîne une baisse de la parasitémie plus importante (ratio minimum avec une pression de 150 nM à 0,155 contre 0,387 avec 24h de pression) et un délai de retour à la parasitémie initiale plus long (7 jours contre 3 avec 24h de pression). La pression par 200 nM pendant 48h a entraîné une diminution de la parasitémie en dessous du seuil de sensibilité du frottis de 0,001 %. Aucun parasite n'a pu être observé sur les frottis pendant les 11 jours qui ont suivi cette pression, et alors que la culture était effectuée sans pipéraquline. Cette concentration est donc trop élevée pour initier une pression de 48h. La durée d'un cycle érythrocytaire du clone W2 étant d'environ 48h, cette durée d'exposition paraît la plus adaptée pour un protocole de culture sous pression discontinue.

Les conditions initiales choisies pour notre protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline sont donc des cycles de 48h d'exposition à 150 nM de pipéraquline. L'effet maximum dans cette configuration s'observant 72h après l'initiation de la pression, il a été décidé de n'augmenter la concentration en pipéraquline que lorsque le retour à la parasitémie initiale s'effectue en moins de 3 jours. La **Figure 25** résume le protocole suivi pour la culture sous pression.

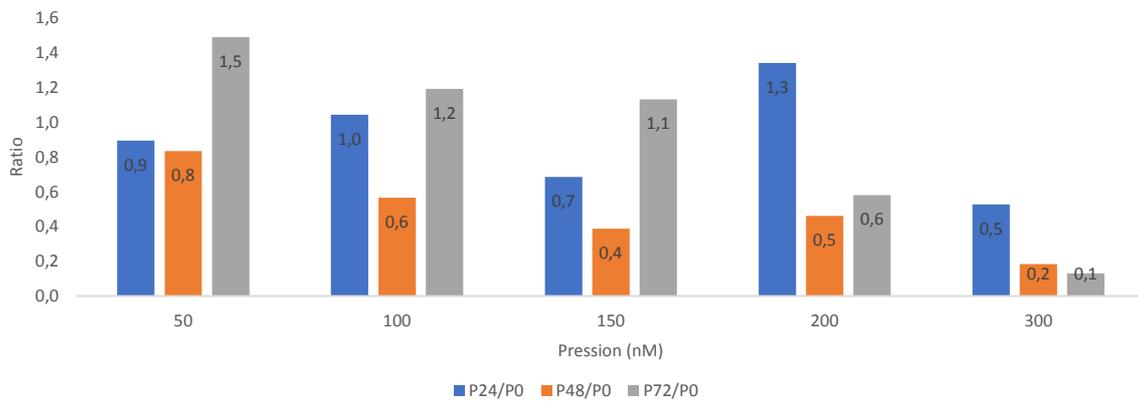


Figure 23. Ratio des parasitémies à 24, 48 et 72 post pression (Pi) sur la parasitémie initiale (P0) pour différentes pressions de 24h

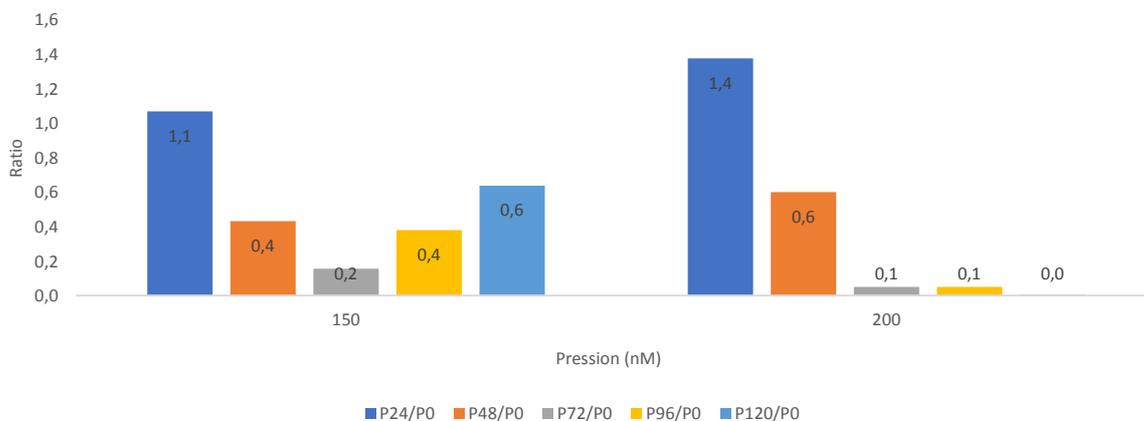


Figure 24. Ratio Pi/P0 en fonction de la pression appliquée pendant 48h.

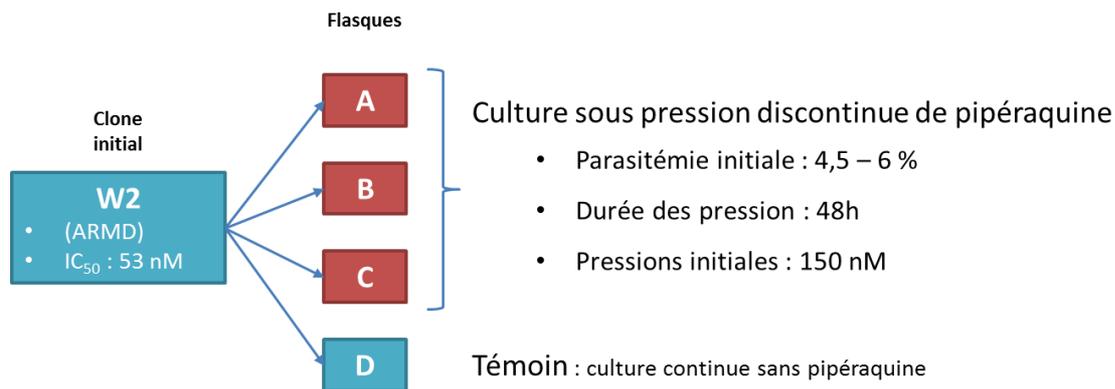


Figure 25. Schéma du protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline

3.4. Initiation du protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline

Le protocole de culture sous pression a été initié et poursuivi pendant 95 jours. Dans la flasque A, les premières pressions ont été bien supportées avec un retour rapide à la parasitémie initiale, permettant un rapprochement des cycles de pression : après 2 pressions par 150 nM de PPQ en moins de 10 jours, la concentration a été doublée. Quatre cycles de pression par 300 nM ont été appliqués. Ces pressions étant bien supportées elles aussi, la concentration a à nouveau été augmentée de 150 nM. Mais après une unique pression par 450 nM, la parasitémie a rapidement chuté en dessous du seuil de détection au frottis (**Figure 26**). Après 4 semaines de suivi, la parasitémie est restée indétectable, et les pressions n'ont donc pu se poursuivre sur cette flasque.

La flasque B a pu subir elle aussi 2 cycles de pression à 150 nM avant de pouvoir passer à 300 nM. Quatre cycles de pression par 300 nM ont été appliqués sur la durée du protocole (**Figure 26**).

Dans la flasque C, les premières pressions ont entraîné des retours très tardifs à la parasitémie initiale, et ce n'est qu'après 7 cycles de pression par 150 nM de PPQ sur 80 jours que la concentration a pu être augmentée pour passer à 200 nM. Une seule pression par 200 nM n'a pu être appliquée (**Figure 26**).

Les CI₅₀ à la pipéraquline ont été déterminées après 27, 86 et 82 jours (J) de pression par pipéraquline pour les flasques A, B et C respectivement. Les résultats indiquent une CI₅₀ doublée dans la flasque A (104,73 nM), et une très légère augmentation de la CI₅₀ de la

souche C (65,71 nM), tandis que la souche B enregistre après près de 3 mois de culture sous pression, une CI_{50} multipliée par 3 (154,12 nM) (Figure 27).



Figure 26. Pressions de PPQ appliquées au cours des 95 jours du protocole dans les flasques A, B et C.

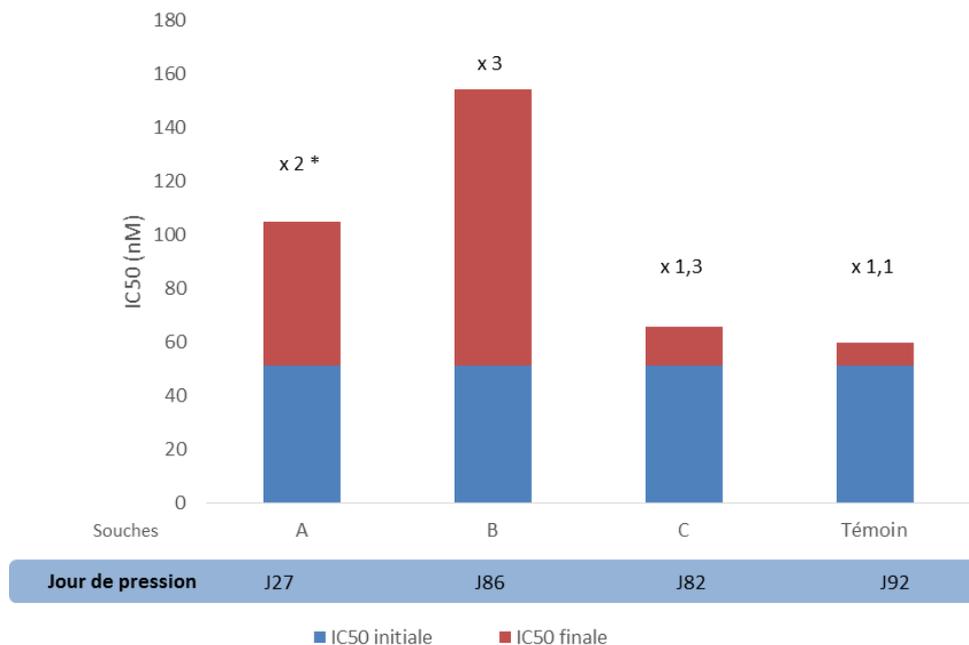


Figure 27. Evolution des CI_{50} dans les 3 flasques sous pression et dans la flasque témoin.

4. Discussion

La résistance aux ACT tient à la résistance à la fois aux dérivés de l'artémisinine et aux molécules associées. Initialement détectée au Cambodge, ce phénomène s'est rapidement propagé à tout le sud-est asiatique, ce qui fait craindre une diffusion prochaine au continent africain. Pour répondre à cette résistance, il devient urgent d'identifier les marqueurs moléculaires qui y sont associés. Avec l'essor de la biologie moléculaire, les marqueurs moléculaires de résistance constituent en effet un moyen de surveillance de la dissémination des résistances rapide et peu coûteux. De plus, ils peuvent permettre de comprendre à la fois les mécanismes d'action des médicaments, et les mécanismes qui permettent à *P. falciparum* d'y échapper. Pourtant, l'identification de ces marqueurs, et leur validation sur des souches cliniques, reste une démarche complexe. Si la résistance aux dérivées de l'artémisinine est désormais mieux appréhendée depuis l'identification des mutations de K13 comme marqueur moléculaire, la résistance à la pipéraquline est encore mal comprise et difficilement identifiable. L'augmentation du nombre de copies du gène *Pfpm2* est une piste prometteuse mais n'est pour l'heure associée à la résistance à la pipéraquline qu'en Asie du sud-est.

L'association d'une augmentation du nombre de copies de ce gène avec la diminution de sensibilité à la pipéraquline a été étudiée ici sur un panel d'isolats de *P. falciparum* de différents pays d'Afrique, et aucune augmentation du nombre de copies de *Pfpm2* n'a été observée sur les échantillons analysés. La taille de notre cohorte (234 isolats) ou la faible proportion d'isolats résistants à la pipéraquline (2 % des isolats testés) constituent certes une limitation de cette étude. La présence d'isolat présentant plusieurs copies de *Pfpm2* au Mozambique a déjà été rapportée par Gupta *et al.* (142), et plus récemment, Inoue *et al.* ont identifié ce polymorphisme dans des infections récurrentes 23 à 65 jours après traitement par DHA-PPQ au Mali, (163). Leroy *et al.* décrivent même une fréquence élevée de cet allèle en Ouganda et au Burkina Faso (164). Il semblerait donc que malgré l'absence de cette mutation sur les isolats de notre étude, elle soit déjà présente en Afrique. Cependant, elle n'a pas été associée à la résistance à la pipéraquline sur ce continent. En effet, dans l'étude de Gupta *et al.*, (142) l'association avec une quelconque résistance à la pipéraquline n'a pas été recherchée, et dans l'étude malienne, la possibilité de réinfection n'a pas clairement été

éliminée. Quant à la mise en évidence d'une fréquence élevée de l'augmentation du nombre de copies de *Pfpm2*, elle intervient alors même qu'une augmentation de la sensibilité à la pipéraquline a été rapportée dans ce pays (165). De plus, les isolats de notre étude résistants *in vitro* à la pipéraquline ne sont pas porteurs de cet allèle, qui serait donc insuffisant à lui seul pour expliquer la diminution de sensibilité à la pipéraquline en Afrique. Le cas clinique rapporté par Russo *et al.* concernant un échec thérapeutique à la DHA-PPQ sans augmentation du nombre de copies de *Pfpm2* vient corroborer cette hypothèse (168). Trois échecs à la DHA-PPQ pour des souches d'importation africaines ont été analysés en 2018 par le CNR et ne montrent pas d'amplification du nombre de copies de *Pfpm2* ni de polymorphisme de *PfK13* (données CNR 2018 non encore publiées).

Il semblerait qu'un certain nombre de marqueurs moléculaires de résistance soient associés à l'origine géographique des parasites. Pour exemple, le marqueur de résistance aux dérivés de l'artémisinine *K13* identifiés dans le sud-est asiatique, n'est pour l'heure pas retrouvé non plus chez les isolats africains cliniquement résistants (143,166,167). Et à l'inverse, un nombre augmenté de copies de *pftetQ* et de *pfmdt* est associé à une diminution de sensibilité *in vitro* à la doxycycline, ou à des échecs prophylactiques en Afrique, alors qu'il ne l'est pas en Asie ou en Amérique du sud (168–172).

Deux autres gènes, *Pfpare* et *Pfcarl*, potentiels marqueurs de multi-résistance identifiés récemment après des expériences de culture sous pression par des antipaludiques en cours de développement, ont été étudiés au cours de ce projet. Les mutations mises en cause par les auteurs ayant mis en évidence ces gènes, n'ont pas été retrouvées sur nos isolats. Hormis p.K784N sur *PFCARL* identifiée chez un seul de nos isolats, nous n'avons en effet retrouvé que des polymorphismes déjà identifiés par ailleurs, et non associés à la diminution de sensibilité à la pipéraquline. Encore une fois, la taille de notre échantillon (respectivement 279 et 257 isolats pour *pfpare* et *pfcarl*) constitue une limite, mais l'absence parmi nos isolats cliniques, des mutations décrites comme associées à la résistance à de nouvelles classes d'antipaludiques, pourrait être encourageante quant au développement de ces nouvelles molécules et à leur efficacité sur ce terrain, et notamment en Afrique. Elles pourraient constituer une option supplémentaire de traitement en cas de perte de sensibilité à l'artémisinine et à ses dérivées.

La résistance à la pipéraquline des isolats de notre étude n'est expliquée ni par l'augmentation du nombre de copies de *Pfpm2*, ni par des mutations des gènes candidats *Pfpare* et *Pfcarl*. De plus, la diminution de sensibilité à la pipéraquline ne semble pas s'expliquer par les mutations conventionnelles sur le gène *Pfcrt* impliquées dans la résistance aux quinoléines (173) ou sur d'autres gènes candidats comme *Pfmdr6* codant une protéine de transport de type ABC (174) ou le gène de la protéine ligase RING E3 ubiquitine, une enzyme de la voie de l'ubiquitylation (175). D'autres mécanismes de résistance sont donc encore à identifier.

Le dernier axe de ce projet a été la mise au point et l'initiation d'un protocole de culture sous pression discontinue de pipéraquline. L'objectif à termes étant l'obtention d'un clone résistant et la comparaison de son génome avec celui du clone initial cultivé sans pipéraquline pour identifier les mutations et les gènes potentiellement en cause dans cette résistance. Cette approche a déjà abouti entre autre, à l'identification de K13 comme marqueur moléculaire de résistance aux dérivés de l'artémisinine (136). Mais elle est aussi très longue (5 ans de culture ont été nécessaires à l'obtention d'un clone résistant de façon stable dans le temps à l'artémisinine), et nécessite des moyens humains importants avec une surveillance de l'évolution des cultures et des changements de milieu quotidiens. Le protocole mis en place dans le cadre de ce projet n'en est qu'à ses débuts, mais déjà il semble que la résistance à la pipéraquline se dessine sur l'une des cultures. Ces premiers résultats sont encourageants, mais nécessitent une confirmation par plusieurs déterminations de CI_{50} . D'autre part, des études récentes indiquent qu'un nouveau test *in vitro*, le Pipéraquline survival assay (PSA), serait plus représentatif de la résistance à la pipéraquline que la détermination de leur CI_{50} (176). Ce test pourra donc aussi être utilisé pour suivre l'évolution de la sensibilité à la pipéraquline de nos cultures. Une fois la résistance avérée, sa stabilité devra encore être vérifiée par culture pendant plusieurs mois en l'absence de pipéraquline. L'implication des mutations ainsi mises en évidence dans la résistance à la pipéraquline pourra ensuite être vérifiée *in vitro* en introduisant les mutations identifiées dans le génome d'un clone sauvage par génie génétique à l'aide d'outils comme CRISPR/Cas9, et en comparant la sensibilité à la pipéraquline de ce clone artificiellement muté et du clone initial. Une confirmation statistique sur des isolats cliniques résistants devra ensuite être recherchée. L'identification de marqueurs moléculaires par pression de

sélection *in vitro* ne présente en effet de l'intérêt que si elle est le reflet de la sélection qui se produit *in vivo*. C'est le cas pour différents marqueurs comme *pfcr*, *pfdhfr*, *pfcytb* ou *pfk13* par exemple, sur lesquels on retrouve les mêmes mutations après expérience de sélection *in vitro* par chloroquine, pyriméthamine, atovaquone ou artémisinine respectivement, que celles présentes sur le terrain (uniquement en Asie du sud-est pour *pfk13*). Mais il peut y avoir des divergences, et certaines mutations peuvent n'être retrouvées que *in vitro* (97).

Dans la course qui se mène actuellement pour contrer le phénomène de résistance aux ACT, les solutions sont limitées : il faut pouvoir maintenir l'efficacité de l'arsenal thérapeutique actuellement disponible, et accélérer le développement de nouveaux antipaludiques. C'est pour répondre à ce second point qu'a été créée l'organisation à but non lucratif *Medicines for Malaria Venture*, qui favorise la recherche dans ce sens. Différents antipaludiques sont actuellement en cours de développement, des ozonides qui présentent le même mécanisme d'action que l'artémisinine sans être sensibles aux mutations de *pfk13*, à des familles de molécules au mécanisme d'action totalement différent (inhibiteurs du protéasome, du canal Na⁺ ATPase ou encore d'enzymes mitochondriales). Mais ces molécules ne seront pas disponibles avant quelques années. Des stratégies doivent donc être trouvées pour ralentir la propagation de la résistance. L'alternance entre les différents ACT peut être une solution provisoire : le remplacement de l'artésunate-méfloquine par la DHA-PPQ en Asie du sud-est a en effet été suivie d'une amélioration de l'efficacité de la méfloquine (177). L'extension de la durée du traitement à 5 jours au lieu de 3 pourrait aussi présenter un intérêt. Mais pour pouvoir mettre en place ces modifications des politiques de santé publique au bon endroit et au bon moment, il convient d'identifier rapidement l'émergence de résistance aux molécules partenaires aux dérivés de l'artémisinine. Il faut pour cela disposer de marqueurs moléculaires de résistance validés pour ces molécules, dont la pipéraquline. Les recherches en ce sens doivent donc se poursuivre.

THÈSE SOUTENUE PAR : Marie Gladys ROBERT

TITRE :

IDENTIFICATION ET VALIDATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA DIMINUTION DE SENSIBILITE A LA PIPERAQUINE CHEZ *Plasmodium falciparum*

CONCLUSION

Les combinaisons à base d'artémisinine sont actuellement la pierre angulaire du traitement antipaludique, mais l'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine et aux molécules partenaires dont la pipéraquline vient compromettre l'efficacité de ces traitements. De nouveaux outils tels que les marqueurs moléculaires de résistance sont nécessaires pour comprendre et surveiller ces résistances.

Ce travail avait pour objectif d'identifier les marqueurs moléculaires associés à la résistance à la pipéraquline. Pour cela, l'implication de l'augmentation du nombre de copies du gène *Plasmepsin 2*, candidat marqueur moléculaire, a d'abord été vérifiée par étude d'association phénotype – génotype sur une cohorte de 377 isolats de *Plasmodium falciparum* provenant d'Afrique. Ensuite, l'association entre résistance à la pipéraquline et mutations sur les gènes *Pfpare* et *Pfcarl*, impliqués dans la résistance à d'autres antipaludiques, a été recherchée sur cette même cohorte. Enfin, pour identifier de nouveaux marqueurs moléculaires, un protocole de culture *in vitro* sous pression de pipéraquline a été initié.

Cinq isolats de cette cohorte présentaient une résistance *in vitro* à la pipéraquline, mais aucun ne présentait d'augmentation du nombre de copies du gène *Plasmepsin 2*, pourtant impliquée dans la résistance à la pipéraquline en Asie du sud-est. Bien que la présence de ce polymorphisme ait été relevée par d'autres auteurs dans certains pays d'Afrique, il n'a pas été associé à la résistance à la pipéraquline sur ce continent. Il se pourrait donc que les déterminants de la résistance à la pipéraquline diffèrent entre Afrique et Asie. D'autre part, aucune association n'a été identifiée entre les mutations sur les gènes *Pfcarl* et *Pfpare* et la résistance à la pipéraquline des isolats de cette cohorte. La résistance à la pipéraquline de ces

isolats africains n'est donc expliquée par aucun de ces candidats marqueurs moléculaires. Bien que ces résultats doivent être confirmés sur une cohorte africaine plus importante, et comptant plus d'isolats résistants à la pipéraquline, ils suggèrent l'existence d'autres mécanismes de résistance, et donc d'autres marqueurs moléculaires.

La sélection in vitro de clones résistants par culture sous pression est un des moyens permettant d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires. Le protocole initié lors de ce travail a permis en 3 mois d'obtenir une souche dont la CI_{50} à la pipéraquline a été multipliée par 3 par rapport au clone initial. Cette augmentation est encore limitée, mais ce résultat est encourageant, et indique que le protocole mis en place est efficace, et qu'il pourrait permettre d'obtenir à terme, un clone totalement résistant à la pipéraquline. Une fois obtenu, la comparaison du génome de ce clone à celui du clone initial permettra de mettre en évidence les mutations et les gènes potentiellement en cause dans la résistance, et des outils d'ingénierie du génome pourront être utilisés pour prouver l'implication de ces mutations.

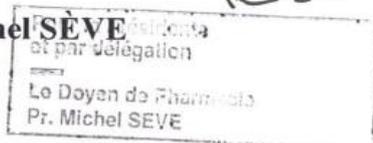
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 17/09/18

LE DOYEN


Pour la Présidence
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Pr. Michel SEVE

le 17/09/18

Présidence
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. Muriel CORNET

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization. 2017;Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. OMS. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030. :39.
3. Leang R, Barrette A, Bouth DM, Menard D, Abdur R, Duong S, et al. Efficacy of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2013;57(2):818-26.
4. Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C, U.S. Army Military Malaria Research Program, National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control (CNM), Royal Cambodian Armed Forces. Dihydroartemisinin-piperaquine failure in Cambodia. *N Engl J Med.* 31 juill 2014;371(5):484-5.
5. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* févr 2017;17(2):164-73.
6. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis.* févr 2017;17(2):174-83.
7. Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, et al. Early Origin and Recent Expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science.* 11 avr 2003;300(5617):318-21.
8. Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol.* 1 juill 1995;12(4):616-26.
9. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, André C, Halbwx M, et al. On the Diversity of Malaria Parasites in African Apes and the Origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLOS Pathog.* 12 févr 2010;6(2):e1000765.
10. Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 15 avr 1991;88(8):3140-4.
11. Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci.* 1 sept 2009;106(35):14902-7.
12. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature.* sept 2010;467(7314):420-5.
13. Coluzzi M. The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia.* sept 1999;41(1-3):277-83.
14. Kwiatkowski DP. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *Am J Hum Genet.* 1 août 2005;77(2):171-92.
15. Lalremruata A, Ball M, Bianucci R, Welte B, Nerlich AG, Kun JFJ, et al. Molecular Identification of Falciparum Malaria and Human Tuberculosis Co-Infections in Mummies from the Fayum Depression (Lower Egypt). *PLOS ONE.* 2 avr 2013;8(4):e60307.
16. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. *JAMA.* 17 févr 2010;303(7):638-47.
17. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors.* 1 févr 2010;3:5.
18. Hoeppli R. The knowledge of parasites and parasitic infections from ancient times to the 17th century. *Exp Parasitol.* 1 juill 1956;5(4):398-419.
19. Butler A, Khan S, Ferguson E. A brief history of malaria chemotherapy. *J R Coll Physicians*

Edinb. 14 juin 2010;40(2):172-7.

20. PETITHORY JC. A propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran Bône 1878 - Constantine 1880. In: HISTOIRE DES SCIENCES MÉDICALES. 1995.
21. Centre national de référence du Paludisme. Rapport annuel d'activité. 2017.
22. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature*. févr 2002;415(6872):680-5.
23. Gallup JL, Sachs JD. The Economic Burden of Malaria [Internet]. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2001 [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2624/>
24. Holding PA, Snow RW. Impact of *Plasmodium falciparum* Malaria on Performance and learning: Review of the Evidence [Internet]. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2001 [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2614/>
25. OMS | Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 [Internet]. WHO. [cité 6 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/>
26. Hennig W. Phylogenetic Systematics. *Annu Rev Entomol*. 1965;10(1):97-116.
27. Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Pawlowski J. Phylogenomics reveals a new 'megagroup' including most photosynthetic eukaryotes. *Biol Lett*. 23 août 2008;4(4):366-9.
28. Zhao S, Burki F, Brâte J, Keeling PJ, Klaveness D, Shalchian-Tabrizi K. Collodictyon—An Ancient Lineage in the Tree of Eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 1 juin 2012;29(6):1557-68.
29. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005;52(5):399-451.
30. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. sept 2012;59(5):429-93.
31. Garcia LS. Malaria and Babesiosis. In: Diagnostic Medical Parasitology. 5th éd. American Society for Microbiology Press; 2006. p. 142-89.
32. Simpson JA, Silamut K, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, White NJ. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1 mars 1999;93(2):165-8.
33. Mercereau-Puijalon O, Ménard D. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: A paradigm revisited. *Transfus Clin Biol*. 1 sept 2010;17(3):176-83.
34. Beg MA, Khan R, Baig SM, Gulzar Z, Hussain R, Jr RAS. Cerebral involvement in benign tertian malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1 sept 2002;67(3):230-2.
35. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* Malaria. *Emerg Infect Dis*. janv 2005;11(1):132-4.
36. Genton B, D'Acromont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. *PLOS Med*. 17 juin 2008;5(6):e127.
37. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. *Am J Trop Med Hyg*. 1 déc 2007;77(6_Suppl):79-87.
38. Stephens JWW. A New Malaria Parasite of Man. *Ann Trop Med Parasitol*. 30 déc 1922;16(4):383-8.
39. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *J Infect Dis*. 15 mai 2010;201(10):1544-50.
40. Lysenko AJ, Beljaev AE. An analysis of the geographical distribution of *Plasmodium ovale*. *Bull World Health Organ*. 1969;40(3):383-94.

41. Fuehrer H-P, Habler VE, Fally MA, Harl J, Starzengruber P, Swoboda P, et al. *Plasmodium ovale* in Bangladesh: Genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in southern Asia. *Int J Parasitol.* 1 juin 2012;42(7):693-9.
42. Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health.* 7(3):231-9.
43. Li P, Zhao Z, Xing H, Li W, Zhu X, Cao Y, et al. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* infections in the China–Myanmar border area. *Malar J.* 15 nov 2016;15(1):557.
44. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends Parasitol.* 1 juin 2007;23(6):278-83.
45. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev.* 10 janv 2007;20(4):579-92.
46. Vinetz JM, Li J, McCutchan TF, Kaslow DC. *Plasmodium malariae* Infection in an Asymptomatic 74-Year-Old Greek Woman with Splenomegaly. *N Engl J Med.* 5 févr 1998;338(6):367-71.
47. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet.* 27 mars 2004;363(9414):1017-24.
48. Ahmed MA, Cox-Singh J. *Plasmodium knowlesi* – an emerging pathogen. *Isbt Sci Ser.* avr 2015;10(Suppl 1):134-40.
49. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Malaria in Human, Thailand. *Emerg Infect Dis.* déc 2004;10(12):2211-3.
50. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: A Malaria Parasite of Monkeys and Humans. *Annu Rev Entomol.* 2012;57(1):107-21.
51. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors.* 4 avr 2012;5:69.
52. Carnevale P, Robert V, éditeurs. Les anophèles: Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle [Internet]. IRD Éditions; 2009 [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/10374>
53. Pages F, Orlandi-pradines E, Corbel V. Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine Mal Infect.* mars 2007;37(3):153-61.
54. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* oct 2002;419(6906):498-511.
55. Kooij TWA, Janse CJ, Waters AP. *Plasmodium* post-genomics: better the bug you know? *Nat Rev Microbiol.* mai 2006;4(5):344-57.
56. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *The Lancet.* 28 févr 2014;383(9918):723-35.
57. Groupe recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Prise en charge et prévention du paludisme d’importation - Mise à jour 2017 des RPC 2007. 2017.
58. World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 avr 2000;94:1-90.
59. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The Burden of Malaria in Pregnancy in Malaria-Endemic Areas [Internet]. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2001 [cité 11 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2623/>
60. Desoubeaux G, Chandénier J. Diagnostic biologique du paludisme d’importation. *Rev Francoph Lab.* 1 déc 2017;2017(497):34-43.
61. Ambroise-Thomas P, Pinel C, Pelloux H, Picot S. Le diagnostic du paludisme : actualités et perspectives. *Cah Détudes Rech Francoph Santé.* 1 juill 1993;3(4):280-4.

62. World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance - Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6 (2014–2015). Geneva, Switzerland; 2015.
63. Organization WH. Guidelines for the Treatment of Malaria. Third Edition. World Health Organization; 2015. 317 p.
64. Kumar N, Pande V, Bhatt RM, Shah NK, Mishra N, Srivastava B, et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. *Acta Trop.* janv 2013;125(1):119-21.
65. Parr JB, Verity R, Doctor SM, Janko M, Carey-Ewend K, Turman BJ, et al. Pfhrp2-Deleted *Plasmodium falciparum* Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey. *J Infect Dis.* 1 juill 2017;216(1):36-44.
66. Kozycki CT, Umulisa N, Rulisa S, Mwikarago EI, Musabyimana JP, Habimana JP, et al. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of *Plasmodium falciparum* isolates lacking hrp2 and declining malaria transmission. *Malar J.* 20 mars 2017;16(1):123.
67. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol.* juin 2009;47(2):93-102.
68. Touze JE, Fourcade L, Pradines B, Hovette P, Paule P, Heno P. Les modes d'action des antipaludiques Intérêt de l'association Atovaquone-Proguanil. :6.
69. Olliaro P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther.* 1 févr 2001;89(2):207-19.
70. Briolant S, Pradines B, Basco LK. Place de la primaquine dans la lutte contre le paludisme en Afrique francophone. *Bull Société Pathol Exot.* août 2017;110(3):198-206.
71. Misbahi H. Paludisme : mode d'action de la chloroquine et mécanisme de la chloroquinorésistance. *J Pharm Clin.* 1 sept 2013;32(3):143-53.
72. Su X, Miller LH. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci.* nov 2015;58(11):1175-9.
73. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. *Molecules.* 12 mars 2010;15(3):1705-21.
74. World Health Organisation. Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO Technical Consultation. Geneva: World Health Organization; 2001 avr.
75. McFadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. *Int J Parasitol.* 1 févr 2017;47(2):137-44.
76. Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines Specifically Target the Apicoplast of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 9 janv 2006;50(9):3124-31.
77. Gaillard T, Madamet M, Pradines B. Tetracyclines in malaria. *Malar J.* 10 nov 2015;14(1):445.
78. Davis TME, Hung T-Y, Sim I-K, Karunajeewa HA, Ilett KF. Piperaquine: A Resurgent Antimalarial Drug. *Drugs.* janv 2005;65(1):75-87.
79. Jullien V. Pharmacocinétique des antipaludiques. *Lett L'Infectiologue.* Tome XXVII(6):239-43.
80. Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH, et al. Chemotherapy of malaria. *Rev 2nd Ed Geneva World Health Organ [Internet].* 1986 [cité 18 juill 2018]; Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/38605>
81. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva; 2009.
82. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2010;2010(422):51-62.
83. Nsanzabana C, Djalle D, Guérin PJ, Ménard D, González IJ. Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. *Malar J.* 8 févr 2018;17:75.

84. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 1 avr 2003;19(4):175-81.
85. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 20 août 1976;193(4254):673-5.
86. Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL. *Plasmodium falciparum*: Assessment of in vitro growth by [3H]hypoxanthine incorporation. *Exp Parasitol.* 1 févr 1983;55(1):138-46.
87. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2002;46(6):1658-64.
88. Blanc C, Moreno A, Jacquier P, Druilhe P, Brasseur PH. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1 mai 2001;64(5):233-41.
89. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 5 janv 2004;48(5):1803-6.
90. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 30 juill 2009;361(5):455-67.
91. Witkowski B, Khim N, Chim P, Kim S, Ke S, Kloeung N, et al. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 3 déc 2012;AAC.01868-12.
92. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 1 déc 2013;13(12):1043-9.
93. Culleton R, Martinelli A, Hunt P, Carter R. Linkage group selection: Rapid gene discovery in malaria parasites. *Genome Res.* 1 janv 2005;15(1):92-7.
94. Carter R, Hunt P, Cheesman S. Linkage Group Selection – A fast approach to the genetic analysis of malaria parasites. *Int J Parasitol.* 1 mars 2007;37(3):285-93.
95. Mwangi JM, Ranford-Cartwright LC. Genetic and genomic approaches for the discovery of parasite genes involved in antimalarial drug resistance. *Parasitology.* oct 2013;140(12):1455-67.
96. Debette S. Comment lire une étude d'association génétique pangénomique (GWAS)? *Sang Thromb Vaiss.* mai 2012;(5):240–247.
97. Anderson T, Nkhoma S, Ecker A, Fidock D. How can we identify parasite genes that underlie antimalarial drug resistance? *Pharmacogenomics.* janv 2011;12(1):59-85.
98. Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull World Health Organ.* 1998;76(1):11;6.
99. Hanboonkunupakarn B, White NJ. The threat of antimalarial drug resistance. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 7 juill 2016;2(1):10.
100. Fogh S, Jepsen S, Effersøe P. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;73(2):228-9.
101. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrées du Loû A, Delaunay V, et al. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C R Acad Sci III.* août 1998;321(8):689-97.
102. World Health Organisation, éditeur. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva; 2006. 253 p.
103. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N Engl J Med.* 11 déc 2008;359(24):2619-20.
104. Hien TT, Thuy-Nhien NT, Phu NH, Boni MF, Thanh NV, Nha-Ca NT, et al. In vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malar J.* 26 oct 2012;11(1):355.
105. Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, Aye MM, Aye KH, Aye MM, et al. Reduced Susceptibility of

Plasmodium falciparum to Artesunate in Southern Myanmar. PLOS ONE. 8 mars 2013;8(3):e57689.

106. Phyo 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*. 26 mai 2012;379(9830):1960-6.

107. Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, et al. Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health*. 11(9):1360-6.

108. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against Falciparum Malaria on the Cambodia–Thailand Border. *Emerg Infect Dis*. mai 2008;14(5):716-9.

109. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother*. 8 janv 2015;59(8):4719-26.

110. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, et al. Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. mars 2016;16(3):357-65.

111. Ecker A, Lehane AM, Clain J, Fidock DA. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol*. nov 2012;28(11):504-14.

112. Blasco B, Leroy D, Fidock DA. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat Med*. août 2017;23(8):917-28.

113. Ménard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;a025619.

114. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. 1 avr 2002;2(4):209-18.

115. Duru V, Witkowski B, Ménard D. Plasmodium falciparum Resistance to Artemisinin Derivatives and Piperaquine: A Major Challenge for Malaria Elimination in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg*. 7 déc 2016;95(6):1228-38.

116. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett*. 6 juin 2011;585(11):1551-62.

117. Klein EY. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *Int J Antimicrob Agents*. 1 avr 2013;41(4):311-7.

118. Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci*. 15 avr 1991;88(8):3382-6.

119. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Mol Cell*. oct 2000;6(4):861-71.

120. 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*. 25 janv 2001;344(4):257-63.

121. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 1 juill 2007;23(7):332-9.

122. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *The Lancet*. 31 juill 2004;364(9432):438-47.

123. Sidhu ABS, Uhlemann A-C, Valderramos SG, Valderramos J-C, Krishna S, Fidock DA. Decreasing pfmdr1 Copy Number in *Plasmodium falciparum* Malaria Heightens Susceptibility to Mefloquine, Lumefantrine, Halofantrine, Quinine, and Artemisinin. *J Infect Dis*. 15 août 2006;194(4):528-35.

124. Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci*. 1 févr 1994;91(3):1143-7.
125. Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, Bailey R, Snounou G, Targett GA, et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr 1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*. mars 1997;114(3):205-11.
126. Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J, Furuya T, et al. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol*. 49(4):977-89.
127. Dahlström S, Veiga MI, Mårtensson A, Björkman A, Gil JP. Polymorphism in PfMRP1 (*Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance Protein 1) Amino Acid 1466 Associated with Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 6 janv 2009;53(6):2553-6.
128. Sibley CH, Hyde JE, Sims PFG, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*. 1 déc 2001;17(12):582-8.
129. Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol Rev*. 1 mars 2005;57(1):117-45.
130. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* Cytochrome b That Are Associated with Atovaquone Resistance Are Located at a Putative Drug-Binding Site. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 août 2000;44(8):2100-8.
131. Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. 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. *Malar J*. 19 mars 2003;2(1):5.
132. Henry M, Briolant S, Zettor A, Pelleau S, Baragatti M, Baret E, et al. *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ Exchanger 1 Transporter Is Involved in Reduced Susceptibility to Quinine. *Antimicrob Agents Chemother*. 5 janv 2009;53(5):1926-30.
133. Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su X, et al. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol*. 52(4):985-97.
134. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, MacInnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*. juin 2013;45(6):648-55.
135. Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Tan JC, et al. A Major Genome Region Underlying Artemisinin Resistance in Malaria. *Science*. 6 avr 2012;336(6077):79-82.
136. 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*. 2 janv 2014;505(7481):50-5.
137. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*. 23 janv 2015;347(6220):428-31.
138. Ghorbal M, Gorman M, Macpherson CR, Martins RM, Scherf A, Lopez-Rubio J-J. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol*. août 2014;32(8):819-21.
139. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnikaa AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med*. 23 juin 2016;374(25):2453-64.
140. Semenov A, Olson JE, Rosenthal PJ. Antimalarial Synergy of Cysteine and Aspartic Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 9 janv 1998;42(9):2254-8.
141. Mukherjee A, Gagnon D, Wirth DF, Richard D. Inactivation of Plasmepsins 2 and 3 Sensitizes *Plasmodium falciparum* to the Antimalarial Drug Piperaquine. *Antimicrob Agents Chemother*. 4 janv 2018;62(4):e02309-17.
142. Gupta H, Macete E, Buló H, Salvador C, Warsame M, Carvalho E, et al. Drug-Resistant

- Polymorphisms and Copy Numbers in *Plasmodium falciparum*, Mozambique, 2015. *Emerg Infect Dis.* janv 2018;24(1):40-8.
143. Russo G, L'Episcopia M, Menegon M, Souza SS, Dongho BGD, Vullo V, et al. Dihydroartemisinin–piperaquine treatment failure in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria case imported from Ethiopia. *Infection.* 6 juill 2018;1-4.
144. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner SF, Mukherjee A, Lim P, et al. Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun.* 2 mai 2018;9(1):1769.
145. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLOS ONE.* 17 juin 2013;8(6):e62906.
146. LaMonte G, Lim MY-X, Wree M, Reimer C, Nachon M, Corey V, et al. Mutations in the *Plasmodium falciparum* Cyclic Amine Resistance Locus (PfCARL) Confer Multidrug Resistance. *mBio.* 7 sept 2016;7(4):e00696-16.
147. Magistrado PA, Corey VC, Lukens AK, LaMonte G, Sasaki E, Meister S, et al. *Plasmodium falciparum* Cyclic Amine Resistance Locus (PfCARL), a Resistance Mechanism for Two Distinct Compound Classes. *ACS Infect Dis.* 11 nov 2016;2(11):816-26.
148. Istvan ES, Mallari JP, Corey VC, Dharia NV, Marshall GR, Winzeler EA, et al. Esterase mutation is a mechanism of resistance to antimalarial compounds. *Nat Commun.* 20 janv 2017;8:14240.
149. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. Pfhrp2 and pfhrp3 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J.* 24 janv 2013;12(1):34.
150. Le Nagard H, Vincent C, Mentré F, Le Bras J. Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput Methods Programs Biomed.* oct 2011;104(1):10-8.
151. Fall B, Madamet M, Camara C, Amalvict R, Fall M, Nakoulima A, et al. *Plasmodium falciparum* In Vitro Resistance to Monodesethylamodiaquine, Dakar, Senegal, 2014. *Emerg Infect Dis.* mai 2016;22(5):841-5.
152. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209–219.
153. Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 2008;36(suppl_2):W163-9.
154. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 2007;35(suppl_2):W71-4.
155. Nzila A, Mwai L. In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 2010;65(3):390-8.
156. Oduola AMJ, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE. *Plasmodium falciparum*: Cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity in vitro. *Exp Parasitol.* 1 juin 1988;66(1):86-95.
157. Rathod PK, McErlean T, Lee P-C. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 août 1997;94(17):9389-93.
158. Ramakrishnan SP, SATYA P, Chowdhury DS, Basu PC, others. Studies on *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. Part XXIX. The Size of Parasite Population and its Relation to the Selection of a Strain Resistant to Sulphadiazine. *Indian J Malariol.* 1961;15(2):95–106.
159. Martin DC, Arnold JD. The effect of parasite populations on the curative action of pyrimethamine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 janv 1968;62(3):379-84.
160. Moll K. II. Freezing and thawing of asexual *Plasmodium spp.* *Methods Malar Res.* 2008;12.
161. Robert MG, Tsombeng FF, Gendrot M, Mosnier J, Amalvict R, Benoit N, et al. Absence of High Level of Duplication of the plasmepsin 2 Gene in Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 4 sept

2018;AAC.00374-18.

162. Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 2009;37(suppl_1):D539-43.
163. Inoue J, Silva M, Fofana B, Sanogo K, Mårtensson A, Sagara I, et al. *Plasmodium falciparum* Plasmepsin 2 Duplications, West Africa. *Emerg Infect Dis.* août 2018;24(8):1591-3.
164. Leroy D, Macintyre F, Adamy M, Laurijssens B, Klopper R, Khim N, et al. High proportion of multiple copies of *Plasmodium falciparum* Plasmepsin-2 gene in African isolates: Is piperazine resistance emerging in Africa? 3 juill 2018 [cité 31 juill 2018]; Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/361204>
165. Rasmussen SA, Ceja FG, Conrad MD, Tumwebaze PK, Byaruhanga O, Katairo T, et al. Changing antimalarial drug sensitivities in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother.* 18 sept 2017;AAC.01516-17.
166. Sutherland CJ, Lansdell P, Sanders M, Muwanguzi J, Schalkwyk DA van, Kaur H, et al. Pfk13-independent treatment failure in four imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria given artemether-lumefantrine in the UK. *Antimicrob Agents Chemother.* 30 janv 2017;AAC.02382-16.
167. Madamet M, Kounta MB, Wade KA, Lo G, Diawara S, Fall M, et al. Absence of association between polymorphisms in the K13 gene and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites at day 3 after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. *Int J Antimicrob Agents.* 1 juin 2017;49(6):754-6.
168. Madamet M, Gaillard T, Velut G, Ficko C, Houzé P, Bylicki C, et al. Malaria Prophylaxis Failure with Doxycycline, Central African Republic, 2014. *Emerg Infect Dis.* août 2015;21(8):1485-6.
169. Gaillard T, Briolant S, Houzé S, Baragatti M, Wurtz N, Hubert V, et al. PftetQ and pfmdt copy numbers as predictive molecular markers of decreased ex vivo doxycycline susceptibility in imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 14 nov 2013;12:414.
170. Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Isolates to Doxycycline Is Associated with pftetQ Sequence Polymorphisms and pftetQ and pfmdt Copy Numbers. *J Infect Dis.* 1 janv 2010;201(1):153-9.
171. Mura M, Briolant S, Donato D, Volney B, Pelleau S, Musset L, et al. Absence of correlation between ex vivo susceptibility to doxycycline and pftetQ–pfmdt gene polymorphism in French Guiana. *Malar J.* 25 juill 2015;14:286.
172. Gaillard T, Sriprawat K, Briolant S, Wangsing C, Wurtz N, Baragatti M, et al. Molecular Markers and In Vitro Susceptibility to Doxycycline in *Plasmodium falciparum* Isolates from Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* 8 janv 2015;59(8):5080-3.
173. Pascual A, Madamet M, Bertaux L, Amalvict R, Benoit N, Travers D, et al. In vitro piperazine susceptibility is not associated with the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene. *Malar J.* 25 nov 2013;12(1):431.
174. Gendrot M, Diawara S, Madamet M, Kounta MB, Briolant S, Wade KA, et al. Association between Polymorphisms in pfmdr6 Gene and Ex Vivo Susceptibility to Quinine in *Plasmodium falciparum* Parasites from Dakar, Senegal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;AAC-01183.
175. Gendrot M, Foguim FT, Robert MG, Amalvict R, Mosnier J, Benoit N, et al. The D113N mutation in the RING E3 ubiquitin protein ligase gene is not associated with ex vivo susceptibility to common anti-malarial drugs in African *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J.* 12 mars 2018;17(1):108.
176. Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperazine in vitro assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med.* 22 déc 2015;13(1):305.
177. Lim P, Dek D, Try V, Sreng S, Suon S, Fairhurst RM. Decreasing pfmdr1 copy number suggests that *Plasmodium falciparum* in Western Cambodia is regaining in vitro susceptibility to mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother.* 23 févr 2015;AAC.05163-14.

ANNEXES

Annexe 1

Absence of High Level of Duplication of the *plasmepsin 2* Gene in Africa

Manuscript number: AAC00374-18R2

Status: Accepted (2018-08-16)

Available at:

<https://aac-asm-org.gaelnomade-1.grenet.fr/content/early/2018/08/28/AAC.00374-18>

Running title: *P. falciparum* plasmepsin 2 copy number

Marie Gladys Robert,^{a,b} Francis Foguim Tsombeng,^{a,b} Mathieu Gendrot,^{a,b} Joel Mosnier,^{a,b,c}
Rémy Amalvict,^{a,b,c} Nicolas Benoit,^{a,b,c} Marilyn Torrentino-Madamet,^{a,b,c} Bruno Pradines^{a,b,c}
and the French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group

Unité Parasitologie et entomologie, Département des maladies infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection, Marseille, France^a; Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, IHU-Méditerranée Infection^b; Centre National de Référence du Paludisme, Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection, Marseille, France^c

Address for correspondence: Bruno Pradines, Unité Parasitologie et entomologie, Institut de recherche biomédicale des armées, Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; Phone: 33 413 732 231; email: bruno.pradines@gmail.com

Abstract

Resistance to piperazine has been associated with the amplification of the *plasmepsin 2* gene in Cambodia. None of the 175 African isolates that we analyzed had *plasmepsin 2* gene amplification (piperazine inhibitory concentration 50% ranged from 0.94 to 137.5 nM), suggesting a low level of piperazine reduced susceptibility prevalence in Africa. Additionally, the few isolates with reduced susceptibility to piperazine did not harbor amplification of the *plasmepsin 2* gene.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, antimalarial drug, resistance, in vitro, molecular marker, plasmepsin 2, piperazine

Plasmodium falciparum resistance to most antimalarial drugs has emerged in Southeast Asia and spread to Africa (1,2). Since 2005, the World Health Organization (WHO) recommended artemisinin-based combination therapies (ACT) as the first-line treatment for uncomplicated malaria followed by artesunate for the treatment of severe malaria. However, artemisinin derivatives-resistant *P. falciparum* strains emerged in western Cambodia, Myanmar and Thailand and eventually in all of Southeast Asia (3,4). As soon as the last marketed ACT, dihydroartemisinin-piperaquine, was used, resistance emerged in Cambodia and later in Vietnam (5-8). In this context, it is essential to have markers of resistance to monitor the emergence and spread of resistance to dihydroartemisinin-piperaquine. Mutations (Y493H, F446I and C580Y) in the propeller domain of the Kelch 13 (K13) gene (PF3D71343700) were associated with *in vivo* and *in vitro* resistance to artemisinin in Southeast Asia (9,10). Two recent studies showed that *in vitro* and *in vivo* resistance to piperaquine was associated with the amplification of the copy number of the *plasmepsin 2* gene (PF3D7_1408000) (11,12). However, these data were validated only on Cambodian isolates. The objective of the present study was to evaluate the copy number of the gene in African *P. falciparum* isolates and its association with *in vitro* susceptibility to piperaquine.

A total of 175 *P. falciparum* isolates were successfully evaluated for the copy number of the *plasmepsin 2* gene and assessed for *ex vivo* susceptibility to piperaquine. The isolates were collected from patients hospitalized in France from January 2015 to April 2017 with imported malaria from a malaria-endemic country and, more particularly, from African French-speaking countries, such as Côte d'Ivoire, Cameroon, Central African Republic, Republic of Congo, Guinea, Burkina Faso, Togo, Gabon and Senegal (Table 1). The samples were sent from different civilian or military hospitals of the French National Reference Center for Imported Malaria Network (Aix en Provence, Bordeaux, Marseille, Montpellier, Nice, Toulon and Toulouse) to the French National Reference Center for Malaria (IRBA, IHU Méditerranée Infection Marseille).

The parasitemia, which ranged from 0.005% to 9.5%, was estimated on thin blood smears that were stained by eosin and methylene blue using a RAL[®] kit (Réactifs RAL, Paris, France). The diagnosis of *P. falciparum* mono-infection was confirmed by real time PCR (LightCycler 2.0, Roche Group, Switzerland), as previously described (13).

Piperaquine (PPQ) for the *ex vivo* drug susceptibility assay was obtained from Shin Poong Pharm Co (Seoul, Korea). PPQ was first dissolved in methanol and later diluted in water to final concentrations that ranged from 1.9 to 998 nM. The isolates were incubated for 72 hours in a controlled atmosphere set at 85% N₂, 10% O₂, 5% CO₂ and 37°C (maximum final

parasitemia at 0.5% and final hematocrit of 1.5%). The isolates with parasitemia above 0.5% were diluted to 0.5% with fresh uncontaminated erythrocytes. The drug susceptibility assay was revealed by the HRP2 ELISA-based assay implemented in the Malaria Ag Celisa kit (ref KM2159, Cellabs PTY LDT, Brookvale, Australia) as previously described (14). IC₅₀ values were validated only if the optical density (OD) ratio (OD at zero concentration / OD at maximum concentration of drug) was above 1.6 and the 95% confident interval of the IC₅₀ estimation was below 2.0. Each batch of plates was validated on the CQ-resistant W2 clone of Indochina strain (obtained from MR4, VA, USA) in four independent experiments using the same conditions as described below. The mean PPQ 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values for the chloroquine-resistant W2 clone for the different batches used during the study was 54.1 ± 5.4 nM. There was no significant difference in the responses of the strains to PPQ according to the different batches (p = 0.770).

The *plasmepsin 2* copy number was estimated by TaqMan real-time PCR (Lightcycler[®] 2.0, Roche) using the single-copy gene α -*tubulin* (PF10_0084) as control housekeeping gene. The following primers and probes were used: 5'- GGA GAT AAC CAA CAA CCA TTT AC -3', 5'- GTT GTA CAT TTA ACA CTT GGG A-3' and 5'- FAM-CCC ATA AAT TAG CAG ATC CTG TAT C-TAMRA-3' for *plasmepsin 2* and 5'- TGA TGT GCG CAA GTG ATC C-3', 5'- TCC TTT GTG GAC ATT CTT CCT C-3' and 5'- FAM-TAG CAC ATG CCG TTA AAT ATC TTC CAT GTC T-TAMRA-3' for α -*tubulin* (Eurogentec, Angers, France). PCR reactions were carried out using 1 × LightCycler[®] TaqMan[®] Master (ROCHE, Allemagne), 900 nM forward primer, 900 nM reverse primer, 250 nM Taqman probe and 3 µl of template DNA. The thermal cycling conditions were 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each sample was assayed in duplicate. The 2^{-ΔΔCt} method of relative quantification (where Ct indicates cycle threshold) was used and adapted to estimate the copy number of the *plasmepsin 2* gene, by using the formula $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{plasmepsin\ 2}} - C_{t_{\beta-tubulin}})_{sample} - (C_{t_{plasmepsin\ 2}} - C_{t_{\beta-tubulin}})_{calibrator}$. Genomic DNA extracted from the *P. falciparum* 3D7 strain, which has a single copy of each gene, was used as calibrator, and β -*tubulin* served as the control housekeeping gene in all experiments. We previously verified that the PCR efficiency was identical for the two genes. Samples were evaluated twice if the Ct standard deviation was above 0.5 and if the copy number was above 1.5. Isolates with a copy number ≥ 1.6 were classified as isolates with 2 copies (11,15). A control parasite isolate harboring at least two copies of the *plasmepsin 2* gene and sampled in patient with malaria after returning from Cambodia was used to validate the quantitative PCR assay (sample kindly provided by Pr. Houzé).

The *ex vivo* IC₅₀ curves of PPQ were satisfactorily fit to a sigmoidal function. Unlike the cultured-adapted Cambodian parasites (16), none of our isolates exhibited a bimodal dose-response curve when exposed to PPQ. The PPQ IC₅₀ of the 175 isolates ranged from 0.94 to 137.5 nM (Figure 1). A wide range of the PPQ responses was already observed in several studies and whatever the methodology used. PPQ IC₅₀ values, assessed by a 72 hrs incubation with atmospheric generators for capnophilic bacteria and HRP2 ELISA in isolates from Dakar in 2013-2014 and 2013-2015, ranged from 2.5 to 168 nM and 3.9 to 241.9nM, respectively (17,18). The distribution of PPQ IC₅₀ from 313 isolates obtained between 2008 and 2012 from patients hospitalized in France for imported malaria and assessed by a 42 hrs isotopic test ranged from 9.8 to 217.3 nM (19). A wide range of PPQ responses (3.1 to 188.9 nM) was also observed in isolates collected in 2010-2013 in Uganda and assessed using HRP2 ELISA detection (20). Only the isolates collected in 2016 in Uganda and assessed using a 72 hrs fluorescence assay with SYBR green I detection presented a narrow range for PPQ IC₅₀, from 1.8 to 26.6 nM (21). In the absence of standardized *ex vivo* and *in vitro* tests, it is difficult to compare data from different laboratories. IC₅₀ and cutoff values for *in vitro* resistance are specific to the methodology. The *in vitro* effects and the IC₅₀ values for antimalarial drugs depend on incubation and gas conditions and methodology (22-25). The isolates collected in Uganda in 2016 and performed using a 72 hrs fluorescence assay with SYBR green I detection showed a narrow range for PPQ IC₅₀, unlike those collected in 2010-2013 and assessed using HRP2 ELISA that presented a wide range of PPQ responses (20,21). Only the isolates that were assessed with SYBR green I detection showed a narrow range for PPQ IC₅₀. Another hypothesis as a source of variation in drug responses may be the storage and the time between sample collection from patients and the completion of the *ex vivo* test. Blood was collected before therapy in ethylenediaminetetraacetic acid tube. Drug susceptibilities were assessed immediately or from samples stored at 4°C, even during transport, for a maximum of 48 hrs and without short-term culture. After the collection from patients, the storage temperature of the samples was controlled by sensor. Additionally, Senegalese isolates, which were assessed immediately, presented the same wide range of *in vitro* responses (17,18). One isolate had a reduced susceptibility to PPQ (IC₅₀ > 135 nM) (19). Another possible source of variation in the PPQ drug responses could result from the range of parasitemias used in the assay. This is because samples below 0.5% parasitemia were included in the assays, and thus could not be adjusted to the standardized assay parasitemia.

Significant cross-susceptibilities were found between PPQ and mefloquine (coefficient of correlation, $r = 0.453$; $p < 0.0001$), pyronaridine ($r = 0.406$; $p < 0.0001$), quinine ($r = 0.247$;

p = 0.0011) and monodesethylamodiaquine (r = 0.189; p = 0.0138). Associations between PPQ and chloroquine or lumefantrine were not significant (r = 0.137, p = 0.0755 and r = 0.114; p = 0.1413, respectively). The values of the coefficient of determination (r^2) of the different associations were too low to explain the wide range of PPQ responses.

The copy number values ranged from 0.16 to 1.51 with a mean of 1.04 (Figure 2). None of the isolates had more than one copy of the *plasmepsin 2* gene.

We did not observe any *plasmepsin 2* gene amplification in the African isolates analyzed in this study. There was no association between the copy number of the *plasmepsin 2* gene and susceptibility to PPQ. The most representative countries in terms of numbers were the Cameroon and Côte d'Ivoire (47 and 37 isolates, respectively). Seven isolates ($IC_{50} > 90$ nM) were outside the main scatter points representing the distribution of the *in vitro* responses to PPQ (Figure 1) and could be considered as parasites with reduced susceptibility to PPQ, although below 135 nM for six of them. The Cambodian *P. falciparum* strains, which were resistant *ex vivo* to PPQ and showed amplification of the *plasmepsin 2* gene, presented IC_{50} ranged from 89.3 to 159.6 nM (12). Among these seven isolates, four came from Cameroon and two from Côte d'Ivoire, suggesting the presence of few *P. falciparum* strains with reduced susceptibility to PPQ. The primary limitation of the present study is the low number of parasite isolates with reduced susceptibility to PPQ, probably due to the low use of dihydroartemisinin-piperazine in Africa compared to Southeast Asia. Additionally, none of the seven isolates with reduced susceptibility to PPQ ($IC_{50} > 90$ nM) harbored more than one copy of the *plasmepsin 2* gene. This phenomenon was also shown in Cambodian isolates harbouring a single copy of *plasmepsin 2* gene for which a large range of PPQ IC_{50} was observed as well as some parasites with high IC_{50} (12). The use of the standard *ex vivo* assay and not the PPQ survival assay (PSA) can be questionable (11, 26). However, Amato et al identified the same association between *ex vivo* PPQ resistance and the amplification of the *plasmepsin 2* gene by using a standard susceptibility drug assay (12). The resistant parasites showed *ex vivo* IC_{50} values between 89.3 and 159.6 nM and *in vitro* IC_{50} values between 55.9 and 79.7 nM after cultures had adapted, reflecting a high PSA % survival that ranged from 52.2 to 74.9% (12). Additionally, a novel mutation (F145I) on the *P. falciparum* chloroquine resistance transporter gene (*pfcr*) was recently identified and described to have an association with the PPQ IC_{90} values in Cambodian isolates by the standard *in vitro* assay (27). The influence of this mutation will have to be evaluated in African *P. falciparum* isolates.

The amplification of the *plasmepsin 2* gene does not fully explain the *in vitro* susceptibility decreased to PPQ of some *P. falciparum* parasites in Africa. Indeed no

correlation was observed between the copy number of the *plasmepsin 2* gene and *ex vivo* susceptibility to piperazine in *P. falciparum* Ugandan isolates (21). The use of dihydroartemisinin-piperazine as intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp) did not select for genotypes associated with amplification of the *plasmepsin 2* gene in Uganda (28). Additionally, no amplification of the *plasmepsin 2* gene was found in Cameroonian recrudescence *Plasmodium falciparum* parasites two years after treatment by dihydroartemisinin-piperazine (29). Gupta et al. reported that 1.1% of the *Plasmodium falciparum* isolates circulating in Mozambique in 2015 harbored multiple copies of the *plasmepsin 2* gene (30). However, none of these isolates were compared with *in vitro* data or clinical responses. These data do not allow assess the possible association between amplification of the *plasmepsin 2* gene and reduced susceptibility to PPQ. Additionally, Amato et al showed that more than half of isolates harbouring multicopies of the *plasmepsin 2* gene presented low susceptibility to PPQ, suggesting that amplification of the *plasmepsin 2* gene did not alone explain reduced susceptibility to PPQ (12).

These finding suggest that copy number variation of the *plasmepsin 2* gene may not alone predict PPQ resistance in Africa. It seems that over resistance mechanisms and therefore other molecular markers may exist in Africa compared to Asia. This phenomenon has been also observed with resistance to artemisinin which is associated with *pfk13* polymorphisms in Asia, while none polymorphism is observed in most of the cases of clinical failure of ACT in Africa (10,31-35). To overcome the limitation of this study, i.e., the low number of samples with reduced susceptibility, it is imperative to further assess more isolates from different geographical areas of Africa, and especially more *P. falciparum* strains resistant to PPQ from Africa.

Acknowledgments

The authors thank the patients and the staff of the hospitals of the French National Reference Center for Imported Malaria network.

The authors would like to thank Pr. Sandrine Houzé (Centre national de référence du Paludisme, Paris) for providing the clinical sample with two copies of *plasmepsin 2* gene.

This study was funded by the French Institute for Public Health Surveillance (Santé Publique France, grant CNR paludisme). Francis Foguim was supported by the Foundation Méditerranée Infection.

The authors have declared that they have no competing interests.

French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group

D Basset (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier), P Bastien (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier), F Benoit-Vical (Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Toulouse), A Berry (Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Toulouse), P Brouqui (Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille), M Cividin (Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix en Provence), P Delaunay (Centre Hospitalier Universitaire de l'Archet, Nice), L Delhaes (Hôpital Pellegrin, Bordeaux), M Drancourt (Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille), T Gaillard (Hôpital d'Instruction des Armées Saint-Anne, Toulon), A Genin (Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix en Provence), E Garnotel (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille), E Javelle (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille), C L'Ollivier (Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille), M Leveque (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier), D Malvy (Hôpital Pellegrin, Bordeaux), P Marty (Centre Hospitalier Universitaire de l'Archet, Nice), G Ménard (Hôpital d'Instruction des Armées Saint-Anne, Toulon), P Millet (Hôpital Pellegrin, Bordeaux), P Minodier (Hôpital Nord, Marseille), A Mottard (Hôpital de Fréjus-Saint Raphael, Fréjus), P Parola (Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille), R Piarroux (Hôpital la Timone, Marseille), C Pomares-Estran (Centre Hospitalier Universitaire de l'Archet, Nice), M-C Receveur (Hôpital Pellegrin, Bordeaux), A Robin (Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix en Provence), E Sappa (Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix en Provence), H Savini (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille), F Simon (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille), Y Sterkers (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier), C Surcouf (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille), E Varlet (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier), A Wolff (Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille).

Ethics approval and consent to participate

Bio-banking of human clinical samples used for malaria diagnostics and secondary uses for scientific purposes is possible as long as the corresponding patients are informed and have not indicated any objections. This requirement was fulfilled here by giving verbal information to the patients, and no immediate or delayed patient opposition was reported to the hospital clinicians. Informed consent was not required for this study because the sampling procedures and testing are part of the French national recommendations for the care and surveillance of malaria.

References

1. Mita T, Venkatesan M, Ohashi J, Culleton R, Takahashi N, Tsukahara T, Ndounga M, Dysoley L, Endo H, Hombhanje F, Ferreira MU, Plowe CV, Tanabe K. 2011. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant *dhps* alleles in *Plasmodium falciparum* populations. *J Infect Dis* 204:1980-1988.
2. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418:320-323.
3. Dondorp AM., Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arieu F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361:455-467.
4. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Seng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jttamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runcharoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyto AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski D, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulhaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Des D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ. 2015. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371:411-423.
5. Spring MD, Lin JT, Manning JE, Vanachayangkul P, Somethy S, Bun R, Se Y, Chann S, Ittiverakul M, Sia-ngam P, Kuntawunginn W, Arsanok M, Buathong N, Chaorattanakawee S, Gosi P, Ta-aksorn W, Chanarat N, Sundrakes S, Kong N, Heng TK, Nou S, Teja-isavadharm P, Pichyangkul S, Phann ST, Balasubramanian S, Juliano JJ, Meshnick SR, Chour CM, Prom S, Lanteri CA, Lon C, Saunders DL. 2015. Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 15:683-691.

6. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, Sam B, Dek D, Try V, Amato R, Blessborn D, Song L, Tullo GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM. 2016. Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 16:357-365.
7. Phuc BQ, Rasmussen C, Duong TT, Dong LT, Loi MA, Ménard D, Traning J, Bustos D, Ringwald P, Galappaththy GL, Thieu NQ. 2017. Treatment failure of dihydroartemisinin/piperaquine for *Plasmodium falciparum* malaria, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 23:715-717.
8. Thanh NV, Thuy-Nhien N, Tuyen NT, Tong NT, Nha-Ca NT, Dong LT, Quang HH, Farrar J, Thwaites G, White NJ, Wolbers M, Hien TT. 2017. Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam. *Malar J* 16:27.
9. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505:50–55.
10. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnikaa AA, Alam MS, Amodu O, Awab Gr, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Das Thakur G, Dieye A, Djalle D, Dorkenoo MA, Eboumbou Moukoko CE, Espino E, Fandeur T, Ferreira-Da-Cruz Mf, Fola AA, Fuehrer HP, Hassan Am, Herrera S, Hongvanthong B, Houze S, Karim MJ, Jiang L, Kano S, Khan WA, Khanthavong M, Kremsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Laminou IM, Mazarati JB, Menard S, Morlais I, Muhindo Mavoko H, Musset L, Na-Bangchang K, Nambozi M, Niare K, Noedl H, Ouedraogo JB, Pillai DR, Pradines B, Quang Phuc B, Ramharter M, Randrianariveolosia M, Sattabongkot J, Sheikh Omar R, Silue KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang LH, Toure OA, Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale JC, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O; for the K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment consortium (KARMA). 2016. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *N Engl J Med* 374:2453–2464.

11. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale JC, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Puijalon O, Ariey F, Ménard D. 2017. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:174-183.
12. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Neal AT, Sreng S, Suon S, Drury E, Jyothi D, Stalker J, Kwiatkowski DP, Fairhurst RM. 2017. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:164-173.
13. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, Diatta B, Ba Fall K, Saliou Mbaye P, Diémé Y, Bercion R, Wade B, Briolant S, Pradines B. 2013. *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J* 12:34.
14. Fall B, Madamet M, Camara C, Amalvict R, Fall M, Nakoulima A, Diatta B, Diémé Y, Wade B, Pradines B. 2016. *Plasmodium falciparum* in vitro resistance to monodesethylamodiaquine, Dakar, Senegal, 2014. *Emerg Infect Dis* 22:841-845.
15. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McReady R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364:438-447.
16. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner SF, Mukherjee A, Lim P, Dhorda M, Amaratunga C, Woodrow CJ, Ashley EA, White NJ, Dondorp AM, Fairhurst RM, Ariey F, Menard D, Wirth DF, Volkman SK. 2018. *Plasmepsin II-III* copy number accounts for bimodal piperazine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 9:1769.
17. Fall B, Camara C, Fall M, Nakoulima A, Dionne P, Diatta B, Diémé Y, Wade B, Pradines B. 2015. *Plasmodium falciparum* susceptibility to standard and potential anti-malarial drugs in Dakar, Senegal, during the 2013-2014 malaria season. *Malar J* 14:60.
18. Gendrot M, Diawara S, Madamet M, Kouta MB, Briolant S, Wade KA, Fall M, Benoit N, Nakoulima A, Amalvict R, Diémé Y, Fall B, Wade B, Diatta B, Pradines B. 2017. Association between polymorphisms in the *Pfmdr6* gene and ex vivo susceptibility to

- quinine in *Plasmodium falciparum* parasites from Dakar, Senegal. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01183-16.
19. Pascual A, Madamet M, Briolant S, Gaillard T, Amalvict R, Benoit N, Travers D, Pradines B. 2015. Multinormal *in vitro* distribution of *Plasmodium falciparum* susceptibility to piperazine and pyronaridine. *Malar J* 14:49.
 20. Tumwebase P, Conrad MD, Walakira A, LeClair N, Byaruhanga O, Nakazibwe C, Kozak B, Bloome J, Okiring J, Kakuru A, Bigira V, Kapisi J, Legac J, Gut J, Cooper RA, Kanya MR, Havlir DV, Dorsey G, Greehouse B, Nsohya SL, Rosenthal PJ. 2015. Impact of antimalarial treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites isolated from Ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3018-30.
 21. Rasmussen SA, Ceja FG, Conrad MD, Tumwebaze PK, Byaruhanga O, Katairo T, Nsohya SL, Rosenthal PJ, Cooper RA. 2017. Changing antimalarial drug sensitivities in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01516-17.
 22. Pradines b, Rogier C, Fusai T, Mosnier J, Daries W, Baret E, Parzy D. 2001. *In vitro* activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1746-1750.
 23. Briolant S, Parola P, Fusai T, Madamet-Torrentino M, Baret E, Mosnier J, Delmont JP, Parzy D, Minodier P, Rogier C, Pradines B. 2007. Influence of oxygen on asexual blood cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a standardized *in vitro* assay. *Malar J* 6:44.
 24. Pascual A, Basco LK, Baret E, Amalvict R, Travers D, Rogier C, Pradines B. 2011. Use of the atmospheric generators for capnophilic bacteria Genbag-CO₂ for the evaluation of *in vitro* *Plasmodium falciparum* susceptibility to standard anti-malarial drugs. *Malar J* 10:8.
 25. Wein S, Maynadier M, Tran Van Ba C, Cerdan R, Peyrottes S, Fraisse L, Vial H. 2010. Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J Clin Microbiol* 48:1651-1660.
 26. Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, Ke S, Chy S, Eam R, Khean C, Loch K, Ken M, Lek D, Beghain J, Arieu F, Guerin PJ, Huy R, Mercereau-Puijalon O, Witkowski B, Ménard D. 2015. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperazine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med* 13:305.

27. Agrawal S, Moser KA, Morton L, Cummings MP, Parihar A, Dwivedi A, Shetty AC, Drabek EF, Jacob CG, Henrich PP, Parobek CM, Jongsakul K, Huy R, Spring MD, Lanteri CA, Chaorattanakawee S, Lon C, Fukuda MM, Saunders DL, Fidock DA, Lin JT, Juliano JJ, Plowe CV, Silva JC, Takala-Harrison S. 2017. Association of a novel mutation in the *Plasmodium falciparum* chloroquine transporter with decreased piperazine sensitivity. *J Infect Dis* 216:468-476.
28. Conrad MD, Mota D, Foster M, Tukwasibwe S, Legac J, Tumwebaze P, Whalen M, Kakuru A, Nayebare P, Wallender E, Havlir DV, Jagannathan P, Huang L, Aweeka F, Kanya MR, Dorsey G, Rosenthal PJ. 2017. Impact of intermittent preventive treatment during pregnancy in *Plasmodium falciparum* drug resistance-mediating polymorphisms in Uganda. *J Infect Dis* 216:1008-17.
29. Malvy D, Torrentino-Madamet M, L'Ollivier C, Receveur MC, Jeddi F, Delhaes L, Piarroux R, Millet P, Pradines B. 2018. *Plasmodium falciparum* recrudescence two years after treatment of an uncomplicated infection without return to an area where malaria is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01892-17.
30. Gupta H, Macete E, Buló H, Salvador C, Warsame M, Carvalho E, Ménard D, Ringwald P, Bassat Q, Enosse S, Mayor A. 2018. Drug-resistant polymorphisms and copy numbers of *Plasmodium falciparum*, Mozambique, 2015. *Emerg Infect Dis* 24:40-48.
31. Madamet M, Kouta MB, Wade KA, Lo G, Diawara S, Fall M, Bercion R, Nakoulima A, Fall KB, Benoit N, Gueye MW, Fall B, Diatta B, Pradines B. 2017. Absence of association between polymorphisms in the K13 gene and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites at day 3 after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. *Int J Antimicrob Agents* 49:754-756.
32. Dieye B, Affara M, Sangare L, Joof F, Ndiaye YD, Gomis JF, Ndiaye M, Mbaye A, Diakite M, Sy N, Mbengue B, Deme AB, Daniels R, Ahouidi AD, Dieye T, Abdullahi A, Doumbia S, Ndiaye JL, Diarra A, Ismaela A, Coulibaly M, Welty C, Ngwa AA, Shaffer J, D'Alessandro U, Volkman SK, Wirth DF, Krogstad DJ, Koita O, Nwakanma D, Ndiaye D. 2016. West Africa international centers of excellence for malaria research: drug resistance patterns to artemether-lumefantrine in Senegal, Mali, and The Gambia. *Am J Trop Med Hyg* 95:1054-1060.
33. Plucinski MM, Dimbu PR, Macaia AP, Ferreira CM, Samutondo C, Quivinja J, Afonso M, Kiniffo R, Mbounga E, Kelley JS, Patel DS, He Y, Talundzic E, Garrett DO, Halsey ES, Udhayakumar V, Ringwald P, Fortes F. 2017. Efficacy of artemether-lumefantrine,

- artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Angola, 2015. *Malar J* 16:62.
34. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, Goldman I, Lucchi N, Stennies G, MacArthur JR, Udhayakumar V. 2015. Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uíge Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother* 59:437-443.
 35. Sutherland CJ, Lansdell P, Sanders M, Muwanguzi J, van Schalkwyk DA, Kaur H, Nolder D, Tucker J, Bennett HM, Otto TD, Berriman M, Patel TA, Lynn R, Gkrania-Klotsas E, Chiodina PL. 2017. pfk13-independent treatment failure in four imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria treated with artemether-lumefantrine in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02382-16.

Table 1. Geographical repartition of the 175 *Plasmodium falciparum* isolates

Country	Isolates number	Percentage
Cameroon	47	26,9
Cote d'Ivoire	37	21,1
Central African Republic	18	10,3
Guinea	15	8,6
Republic of the Congo	14	8,0
Togo	8	4,6
Burkina Faso	7	4,0
Gabon	7	4,0
Benin	5	2,9
Chad	2	1,1
Comores	2	1,1
Ghana	1	0,6
Madagascar	2	1,1
Mali	2	1,1
Nigeria	2	1,1
Angola	1	0,6
Democratic Republic of the Congo	1	0,6
Djibouti	1	0,6
Senegal	1	0,6

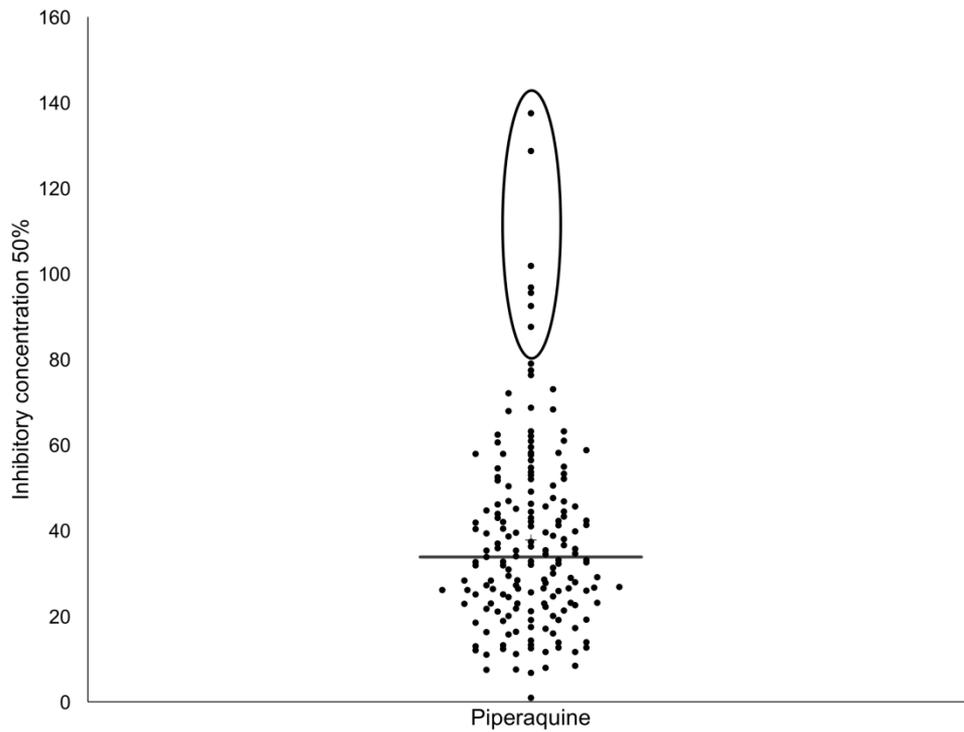


Figure 1. Distribution of *ex vivo* responses (IC₅₀) of 175 African *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine

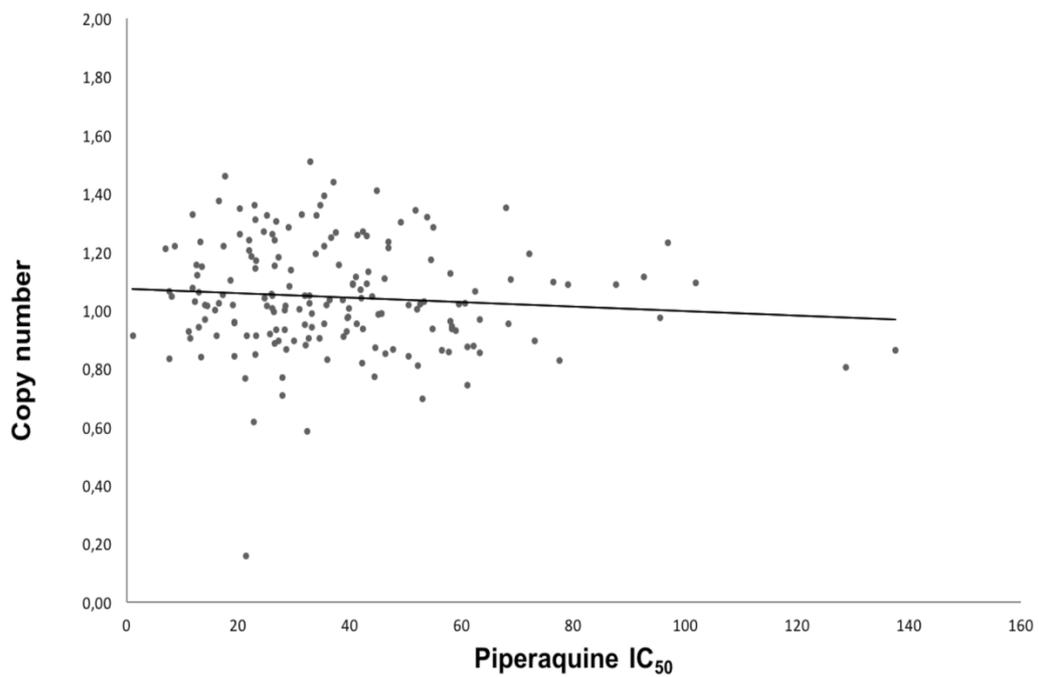


Figure 2. Copy number of the *plasmepsin 2* gene as a function of piperazine IC₅₀ of 175 African *Plasmodium falciparum* isolates

Annexe 2

1 **Baseline *Ex Vivo* and Molecular Responses of *Plasmodium falciparum* isolates to**
2 **Piperaquine before Implementation of Dihydroartemisinin-Piperaquine in Senegal**

3

4 Running title: Piperaquine and exonuclease and *plasmepsin 2* genes

5

6 Marie Gladys Robert,^{a,b} Francis Foguim Tsombeng,^{a,b} Mathieu Gendrot,^{a,b} Silman Diawara,^c
7 Marylin Madamet,^{a,b,d} Mame Bou Kounta,^e Khalifa Ababacar Wade,^e Mansour Fall,^f Mamadou
8 Wague Gueye,^c Nicolas Benoit,^{a,b,d} Aminata Nakoulima,^g Raymond Bercion,^h Rémy
9 Amalvict,^{a,b,d} Bécaye Fall,^c Boubacar Wade,ⁱ Bakary Diatta,^{fi} Bruno Pradines,^{a,b,c,d}

10

11 Unité Parasitologie et entomologie, Département de Biologie des agents transmissibles,
12 Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France^a; Aix Marseille Université,
13 IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Institut hospitalo-universitaire Méditerranée Infection,
14 Marseille, France^b; Laboratoire d'étude de la chimiosensibilité du paludisme, Fédération des
15 laboratoires, Hôpital Principal de Dakar, Dakar, Sénégal^c; Centre National de Référence du
16 Paludisme, Marseille, France^d; Service des Urgences, Hôpital Principal de Dakar, Dakar,
17 Sénégal^e; Service de Réanimation Médicale, Hôpital Principal de Dakar, Dakar, Sénégal^f;
18 Service de Pédiatrie, Hôpital Principal de Dakar, Dakar, Sénégal^g; Laboratoire d'analyses
19 médicales, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal^h; Chefferie, Hôpital Principal de Dakar,
20 Dakar, Sénégalⁱ

21

22 Address for correspondence: Bruno Pradines, Unité Parasitologie et entomologie, Institut de
23 Recherche Biomédicale des Armées, Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée
24 Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; Phone: 33 413 732 231;
25 email: bruno.pradines@gmail.com

26

27 **Abstract**

28 Dihydroartemisinin-piperaquine, which was registered in 2017 in Senegal, is not currently
29 used as the first-line treatment against uncomplicated malaria. A total of 6.6 to 17.1% of *P.*
30 *falciparum* isolates collected in Dakar in 2013-2015 showed *ex vivo* reduced susceptibility to
31 piperaquine. Neither the exonuclease-E415G mutation nor the copy number variation of the
32 *Plasmepsin 2* gene (*Pfpm2*), associated with piperaquine resistance in Cambodia, was
33 detected in Senegalese parasites. *Pfpm2* is not necessary for piperaquine resistance.

34

35 **Keywords:** malaria, *Plasmodium falciparum*, antimalarial drug, *in vitro*, resistance, molecular
36 marker, *Plasmepsin 2*, piperaquine

37 Since 2005, the World Health Organization (WHO) has recommended artemisinin-based
38 combination therapy (ACT) as the first-line treatment against malaria. The emergence of
39 resistance to artemisinins, manifested by delayed parasite clearance after monotherapy with
40 artesunate or ACT, was recently described in Southeast Asia (1,2). Dihydroartemisinin-
41 piperazine is the most recent ACT to be commercialized. However, multidrug resistance to
42 dihydroartemisinin-piperazine is currently emerging in Cambodia, where recrudescence
43 infections have rapidly increased (3-5). Additionally, *in vitro* resistance to piperazine was
44 detected and increased rapidly between 2013 and 2015 in Cambodia (6).

45 Very few cases of resistance to dihydroartemisinin-piperazine have been described in
46 Africa (7). Two cases of late treatment failure after 30 and 32 days was reported in Italian
47 travelers returning from Ethiopia and treated with dihydroartemisinin-piperazine (8,9).

48 Dihydroartemisinin-piperazine obtained marketing authorization only in June 2017 in
49 Senegal. Artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine combinations are currently the
50 ACTs the most used in Senegal. Dihydroartemisinin-piperazine demonstrated a high efficacy
51 in the treatment of uncomplicated malaria or in seasonal intermittent preventive treatment in
52 children in Senegal (10-13).

53 Recently, an increase in the copy number of the *Plasmepsin 2* gene (*Pfpm2*)
54 (PF3D7_1408000), which codes for a protease involved in hemoglobin degradation, has been
55 associated with dihydroartemisinin-piperazine treatment failures and raised piperazine
56 inhibitory concentrations 50% (IC_{50} s) in Cambodia (14,15). The presence of parasites
57 carrying 2 copies of *Pfpm2* was confirmed in 7 infections out of 65 clinical failures to
58 dihydroartemisinin-piperazine in Mali (16).

59 The exonuclease gene (PF3D7_1362500) was one of the 40 candidate drug targets for *P.*
60 *falciparum* identified by *in silico* prediction (17). The mutation E415G in the exonuclease
61 gene (*exo-E415G*) was correlated with high inhibitory concentrations 50% (IC_{50}) of

62 piperazine in 297 isolates from Cambodia (Pursat, Preah and Ratanakiri) obtained from 2011
63 to 2013 (15). This *exo-E415G* mutation was associated with parasite recrudescence following
64 dihydroartemisinin-piperazine treatment.

65 The aim of this study was to establish a susceptibility baseline of *P. falciparum* parasites to
66 piperazine before the implementation of dihydroartemisinin-piperazine combination in
67 Senegal, by evaluating the *P. falciparum* *ex vivo* susceptibility to piperazine and the
68 prevalence of the molecular markers potentially involved in piperazine resistance.

69 A total of 76 *P. falciparum* clinical isolates collected by venous blood samples before
70 treatment from falciparum malaria patients treated at the Hôpital Principal de Dakar from
71 November 2013 to January 2014, August to December 2014 and September to November
72 2015 were assessed for *ex vivo* susceptibility to piperazine and evaluated for the copy
73 number of *Pfpm2* and the *exo-E415G* mutation. Seventy-five percent of the patients were
74 recruited from the emergency department. The patients were treated with quinine until 2014
75 and then with artesunate, artemether-lumefantrine or artesunate-amodiaquine.

76 Parasitemia, which ranged from 0.06 to 14.4% and mono-infection by *P. falciparum* was
77 estimated using a thin blood smear stained with RAL (RAL, Paris, France) and rapid
78 diagnostic test PfHRP2-based Palutop4+® (All Diag, Strasbourg, France).

79 The susceptibility of the isolates was assessed without culture adaptation. The parasitized
80 red blood cells (final maximum parasitemia, 0.5%; final hematocrit, 1.5%) were incubated in
81 96-well plates predosed with antimalarial drugs (piperazine (PPQ), chloroquine (CQ),
82 quinine (QN), monodesethylamodiaquine (DQ), (mefloquine) MQ, lumefantrine (LMF) and
83 dihydroartemisinin (DHA)) for 72 h at 37°C with atmospheric generators for capnophilic
84 bacteria using Genbag CO2 at 5% CO₂ and 15% O₂ (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), as
85 previously described (18,19). PPQ was first dissolved in methanol and then diluted in water
86 to final concentrations that ranged from 1.9 to 998 nM. An *ex vivo* HRP2-based enzyme-

87 linked immunosorbent assay (ELISA) was then performed using a commercial Malaria Ag
88 CELISA kit (reference KM2159; Cellabs PTY Ltd., Brookvale, Australia), as previously
89 described (18,19). Each batch of plates was validated on the CQ-resistant W2 strain (isolated
90 in Indochina; obtained from MR4, VA, USA) in four independent experiments using the same
91 conditions described below. The mean IC₅₀ value for the W2 strain for the different batches
92 used during the three years was 32.5 nM for PPQ (and 292 nM for CQ, 275 nM for QN, 72
93 nM for DQ, 13.7 nM for LMF, 15.4 nM for MQ and 1.27 nM for DHA). A comparison of W2
94 susceptibility data for the 7 antimalarial drugs indicated that there was no significant
95 difference in the responses to antimalarial drugs over the three years (0.39<p<0.95).
96 Additionally, the polymorphic genetic markers *msp1* and *msp2* and microsatellite markers
97 specific to *Plasmodium falciparum* were genotyped at least once a month to verify W2
98 clonality (20,21).

99 The copy number of *Pfpm2* (PF3D7_140800) was assessed by quantitative PCR on the
100 Lightcycler® 2.0 (Roche, Germany), as previously described (22). Isolates with a copy
101 number greater than 1.6 were classified as isolates with 2 copies (14). An isolate collected
102 from a patient with imported malaria after returning from Cambodia and harboring 2 copies of
103 *Pfpm2* was used positive control (sample kindly provided by Pr. Houzé).

104 The two exons of the exonuclease gene (PF3D7_1362500) were amplified by PCR using the
105 following primer pairs: Exo1_F 5'- GGAACATAAGAAGGGTACTGAGC -3' and Exo1_R
106 5'-CATCTGATGATAGGAGGTGCAA-3' for exon 1 and Exo2_F 5'-
107 GAATGGAGTCATTTAGCAGCAA -3' and Exo2_R 5'-
108 CATTCCCATGTACTATCTTTGAACTT - 3' for exon 2. For each exon, a standard PCR was
109 carried out with 25 µl total reaction mixture containing 200 ng of genomic DNA, 0.32 µM of
110 each primer, 1X final concentration of reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.1 mM
111 EDTA, 0.1 M KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20, pH 8.0), 2.5 mM MgCl₂,

112 200 μ M dNTP mixture and 1 U of Red Diamond *Taq*[®] polymerase (Eurogentec, Belgium).
113 The thermal cycler (T3 Biometra) was programmed as follows: 5 min at 95°C then 40 cycles
114 of 30 sec at 95°C, 30 sec at 50°C, 1 min 15 sec at 72°C and a final extension for 10 min at
115 72°C. The amplified fragments were sequenced using the two PCR forward primers on an
116 ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturers' instructions.
117 The sequences were analyzed using Vector NTI advance software (version 11, Invitrogen,
118 Cergy Pontoise, France) to identify the mutations recently shown to be involved in the *ex vivo*
119 susceptibility to PPQ.

120 The Mann-Whitney U test was used to compare susceptible and resistant groups.
121 Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$. Analyses and graphics were
122 performed using XLSTAT software v19.4 (Addinsoft).

123 None of 76 *P. falciparum* Senegalese isolates exhibited a bimodal dose-response curve when
124 exposed to PPQ, unlike Cambodian parasites, and displayed usual sigmoidal doses-responses
125 curves (23-25). The distribution of the IC_{50} values for PPQ and the other six antimalarial
126 drugs is shown in Figure 1. The *ex vivo* PPQ IC_{50} of the 76 isolates ranged from 2.5 to 242
127 nM. This wide range of PPQ responses is in accordance with previous studies on African
128 parasites assessed using a 42 hrs isotopic test or a 72 hrs HRP2 ELISA detection (22,26,27).
129 Only the isolates collected in 2016 in Uganda and assessed using a 72 hrs fluorescence assay
130 with SYBR green I detection presented a narrow range for PPQ IC_{50} , from 1.8 to 26.6 nM
131 (28), unlike those collected in 2010-2013 but evaluated using HRP2 ELISA detection (3.1 to
132 188.9 nM) (27). IC_{50} values depend on methodology, i.e. incubation conditions (gas, time) or
133 detection way (29-32). A limitation could be the use of the standard *ex vivo* assay to assess
134 PPQ susceptibility and not PPQ survival assay (PSA) (23). However, PPQ susceptibility is
135 currently more frequently estimated by standard assay than PSA (15,24,27,28,33,34).

136 The IC_{50} values of isolates with reduced susceptibility to PPQ (6.6%), i.e. IC_{50} values above
137 135 nM, ranged from 139 to 242 nM (26). A total of 17.1% of Senegalese isolates showed
138 IC_{50} above 90 nM. This cut-off of 90 nM was deduced from previous Cambodian data (15).
139 The Cambodian *P. falciparum* strains, which were resistant *ex vivo* to PPQ and showed
140 amplification of *Pfpm2*, showed IC_{50} values ranged from 89.3 to 159.6 nM using *in vitro*
141 standard assay. These data would suggest that 6.9 to 17.1% of the *P. falciparum* isolates from
142 Dakar would have reduced susceptibility to PPQ without any current use of DHA-PPQ in
143 Senegal. Significant associations were found between PPQ and DHA (Pearson's coefficient of
144 correlation of 0.56, $p=0.00002$) and MQ ($r=0.46$, $p=0.00003$). Associations between PPQ and
145 LMF ($r=0.03$, $p=0.770$), DQ (0.07, $p=0.568$), QN ($r=0.05$, $p=0.678$) or CQ ($r=0.09$, $p=0.397$)
146 were weak and not significant. Thirty-one percent and 22% of the variation in the *ex vivo*
147 response to PPQ could be explained by variation in response to DHA and MQ, respectively.
148 Reduced susceptibility to artemisinin derivatives could lead to reduced susceptibility to PPQ
149 by cross-resistance. These data suggest that parasites that would be resistant to ACTs would
150 be resistant to DHA-PPQ. However, all the patients infected with parasites with PPQ
151 susceptibility ranged between 90 and 100 nM were successfully treated artesunate or
152 artemether (35). All the patients infected with parasites with PPQ susceptibility above 100 nM
153 were treated with quinine.

154 The copy number variation of *Pfpm2* was successfully analyzed for 64 isolates (11 from
155 2013, 29 from 2014 and 24 from 2015). The calculated copy numbers ranged from 0.74 to
156 1.31 with a mean of 0.94 ± 0.09 in the PPQ susceptible group (IC_{50} under 135 nM) and $0.96 \pm$
157 0.05 in the group with PPQ reduced susceptibility (IC_{50} above 135 nM) and. Copy numbers
158 were not significantly different between the susceptible and the resistant group ($p = 0.286$)
159 (Figure 2). Additionally, there was no difference in copy number variation between *P.*
160 *falciparum* isolates with IC_{50} under or above 90 nM (0.94 ± 0.11 versus 0.91 ± 0.08).

161 Sequencing of exon 1 and 2 of the exonuclease gene was successfully performed for 76 and
162 77 isolates, respectively. None of the 77 Senegalese isolates successfully sequenced on exon 2
163 harbored the *exo-E415G* mutation, although three other mutations were detected in this gene,
164 including S114C (PPQ IC₅₀= 6.4 nM), N419H (PPQ IC₅₀= 41.1 nM) and T435A (PPQ IC₅₀=
165 65.6 nM). All isolates with a PPQ IC₅₀ above the threshold of 135 nM were wild-type. The
166 E415G mutation and more generally polymorphisms in the exonuclease gene in Senegalese
167 isolates are not associated with *ex vivo* reduced susceptibility to PPQ contrary to what has
168 been previously shown in Cambodian parasites (15).

169 None of the isolates showed amplification of *Pfpm2*, suggesting the absence of PPQ
170 resistance in Dakar. These data are in concordance with those observed in Sierra Leone in
171 2016 (0%) and in Mozambique in 2015 (1.1%) (36,37). Rasmussen *et al.* reported prevalence
172 of multicopy *Pfpm2* above 10% in Uganda (28).

173 Our results show prevalence of 6.6 (IC₅₀ above 135 nM) to 17.1% (IC₅₀ above 90 nM) of *P.*
174 *falciparum* isolates with reduced susceptibility to PPQ in Dakar associated with an absence of
175 *Plasmepsin 2* amplification. These results suggest that multicopy *Pfpm2* is not necessary for
176 PPQ reduced susceptibility. Only 10% of *P. falciparum* isolates collected from clinical
177 failures to DHA-PPQ in Mali carried 2 copies of *Pfpm2* (16). Additionally, no correlation was
178 observed between the copy number of *Pfpm2* and *ex vivo* susceptibility to PPQ in *P.*
179 *falciparum* Ugandan isolates (28). The use of DHA-PPQ as intermittent preventive treatment
180 during pregnancy (IPTp) did not select for genotypes associated with resistance in Cambodia
181 such as the *Pfpm2* or the exonuclease gene (38). No amplification of *Pfpm2* and no *exo-*
182 *E415G* mutation were found in Cameroonian recrudescence *Plasmodium falciparum* parasites
183 two years after treatment by dihydroartemisinin-piperaquine (39). Additionally, parasites
184 collected in malaria case imported from Ethiopia after DHA-PPQ failure had a single copy of
185 *Pfpm2* (9). All these data suggest that multiple copies of *Pfpm2* are not necessary for PPQ

186 resistance in Africa and other genes can be involved. Other genes must be studied, such as the
187 RING E3 ubiquitin protein ligase gene (40) or the *Plasmodium falciparum* multidrug
188 resistance 6 gene (*pfmdr6*) (41). The K76T mutation in the *Plasmodium falciparum*
189 chloroquine resistance transporter gene (*Pfcr1*) which is involved in CQ resistance is not
190 involved in *in vivo* or *ex vivo* PPQ resistance (42,43) but new mutations in this gene, like
191 H97Y, F145I, M343L or G353V, could be (24,34).

192

193

194 **Competing interests**

195 The authors have declared that they have no competing interests.

196

197 **Ethics approval and consent to participate**

198 Bio-banking of human clinical samples used for malaria diagnostics and secondary uses for
199 scientific purposes is possible as long as the corresponding patients are informed and have not
200 indicated any objections. This requirement was fulfilled here by giving verbal information to
201 the patients, and no immediate or delayed patient opposition was reported to the hospital
202 clinicians. Verbal consent was obtained from all the patients or their parents/guardians before
203 blood collection in Dakar. The ethical committee of the Hôpital Principal de Dakar approved
204 the study.

205

206 **Acknowledgments**

207 We thank the patients and the staff of the Hôpital Principal de Dakar and Ndeye Fatou Diop
208 and Maurice Gomis from the Hôpital Principal de Dakar for technical support.

209 The authors would like to thank Pr. Sandrine Houzé (Centre national de référence du
210 Paludisme, Paris) for providing the clinical sample with multiple copies of *Pfpm2*.

211 This research was supported by the Délégation Générale pour l'Armement (grant no PDH-2-
212 NRBC-4-B-4104), the Schéma directeur Paludisme Etat Major des Armées Françaises (grant
213 LR 607) and by the Ministère des Affaires Etrangères. Francis T Foguim was supported by a
214 scholarship from the Foundation Méditerranée Infection.

215

216 References

- 217 1. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson
218 JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S,
219 Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runcharoen R, Hien TT,
220 Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA,
221 Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton
222 PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyo AP, Nosten F,
223 Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA,
224 Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J,
225 Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut
226 B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung
227 S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K,
228 Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ. 2014. Spread of Artemisinin Resistance in
229 *Plasmodium falciparum* Malaria. N Engl J Med 371:411-423.
- 230 2. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F,
231 Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P,
232 Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NPJ, Lindergardh N, Socheat D,
233 White NJ. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med
234 361:455-467.

- 235 3. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, Sam B, Dek D, Try V, Amato
236 R, Blessborn D, Song L, Tullo GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM.
237 2016. Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in
238 Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 16:357-365.
- 239 4. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B,
240 Duru V, Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D. 2015. Evidence of *Plasmodium*
241 *falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperaquine in Western
242 Cambodia: Dihydroartemisinin-piperaquine open-label multicenter clinical assessment.
243 *Antimicrob Agents Chemother* 59:4719-4726.
- 244 5. Spring MD, Lin JT, Manning JE, Vanachayangkul P, Somethy S, Bun R, Se Y, Chann S,
245 Ittiverakul M, Sia-Ngam P, Kuntawunginn W, Arsanok M, Buathong N,
246 Chaorattanakawee S, Gosi P, Ta-Aksorn W, Chanarat N, Sundrakes S, Kong N, Heng TK,
247 Nou S, Teja-Isavadharm P, Pichyangkul S, Pham ST, Balasubramanian S, Juliano JJ,
248 Meshnick SR, Chour CM, Prom S, Lanteri CA, Lon C, Saunders DL. 2015.
249 Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13
250 C580Y in Cambodia: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 15:683-691.
- 251 6. Chaorattanakawee S, Lon C, Jongsakul K, Gawee J, Sok S, Sundrakes S, Kong N,
252 Thammurak C, Chann S, Chattrakarn S, Praditpol C, Buathong N, Uthaimongkol N, Smith
253 P, Sirisopana N, Huy R, Prom S, Fukuda MM, Bethell D, Walsh DS, Lanteri C, Saunders
254 D. 2016. Ex vivo piperaquine resistance developed rapidly in *Plasmodium falciparum*
255 isolates in northern Cambodia compared to Thailand. *Malar J* 15:519.
- 256 7. The West African Network for Clinical Trials of Antimalarial Drugs (WANECAM).
257 2018. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line
258 therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomized, multicentre,
259 open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet* 391:1378-1390.

- 260 8. Gobbi F, Buonfrate D, Menegon M, Lunardi G, Angheben A, Severini C, Gori S, Bisoffi
261 Z. 2016. Failure of dihydroartemisinin-piperaquine treatment of uncomplicated
262 *Plasmodium falciparum* malaria in a traveller coming from Ethiopia. *Malar J* 15:525.
- 263 9. Russo G, L'Episcopia M, Menegon M, Souza SS, Dongho BGD, Vullo V, Lucchi NW,
264 Severini C. 2018. Dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in uncomplicated
265 *Plasmodium falciparum* malaria case imported from Ethiopia. *Infection* 2018 Jul 6. doi:
266 10.1007/s15010-018-1174-9
- 267 10. Sow D, Ndiaye JL, Sylla K, Tine RC, Faye B, Pene M, Ndiaye M, Seck A, Lo AC, Abiola
268 A, Dieng Y, Gaye O. 2016. Evaluation of the efficacy and safety of three 2-drug
269 combinations for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in
270 Senegal: artesunate-amodiaquine, dihydroartemisinin-piperaquine, and artemether-
271 lumefantrine. *Med Sante Trop* 26:45-50.
- 272 11. Yavo W, Faye B, Kuete T, Djohan V, Oga SA, Kassi RR, Diatta M, Ama MV, Tine R,
273 Ndiaye JL, Evi JB, Same-Ekobo A, Faye O, Koné M. 2011. Multicentric assessment of
274 the efficacy and tolerability of dihydroartemisinin-piperaquine compared to artemether-
275 lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in sub-
276 Saharan Africa. *Malar J* 10:198.
- 277 12. Sylla K, Abiola A, Tine RCK, Faye B, Sow D, Ndiaye JL, Ndiaye M, Lo AC, Folly K,
278 Ndiaye LA, Gaye O. 2013. Monitoring the efficacy and safety of three artemisinin based-
279 combinations therapies in Senegal: results from two years surveillance. *BMC Infect Dis*
280 13:598.
- 281 13. Cisse B, Cairns M, Faye E, Ndaiye O, Faye B, Cames C, Cheng Y, Ndaiye M, Lo AC,
282 Simondon K, Trape JF, Faue O, Ndaiye JL, Gaye O, Greenwood B, Milligan P. 2009.
283 Randomized trial of piperaquine with sulfadoxine-pyrimethamine or dihydroartemisinin
284 for malaria intermittent preventive treatment in children. *PLoS One* 4:7164.

- 285 14. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S,
286 Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier
287 C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale JC, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-
288 Puijalon O, Arieu F, Ménard D. 2016. A surrogate marker of piperazine-resistant
289 *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *Lancet Infect*
290 *Dis* 17:174-183.
- 291 15. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Neal
292 AT, Sreng S, Suon S, Drury E, Jyothi D, Stalker J, Kwiatkowski DP, Fairhurst RM. 2016.
293 Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperazine failure in *Plasmodium*
294 *falciparum* malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study. *Lancet Infect*
295 *Dis* 17:164-173.
- 296 16. Inoue J, Silva M, Fofana B, Sanogo K, Martensson A, Sagara I, Björkman A, Veiga MI,
297 Ferreira PE, Djimde A, Gil JP. 2018. *Plasmodium falciparum* *plasmepsin 2* duplications,
298 West Africa. *Emerg Infect Dis* 24:1591-1593.
- 299 17. Ludin P, Woodcroft B, Ralph SA, Mäser P. 2012. In silico prediction of antimalarial drug
300 target candidates. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2:191-199.
- 301 18. Fall B, Camara C, Fall M, Nakoulima A, Dionne P, Diatta B, Diémé Y, Wade B, Pradines,
302 B. 2015. *Plasmodium falciparum* susceptibility to standard and potential anti-malarial
303 drugs in Dakar, Senegal, during the 2013–2014 malaria season. *Malar J* 14:60.
- 304 19. Fall B, Madamet M, Camara C, Amalvict R, Fall M, Nakoulima A, Diatta B, Diémé Y,
305 Wade B, Pradines B. 2016. *Plasmodium falciparum* in vitro resistance to
306 monodesethylamodiaquine, Dakar, Senegal, 2014. *Emerg Infect Dis* 22:841-845.
- 307 20. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, Garnotel E, Pradines
308 B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C. 2006.

- 309 Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban
310 and rural areas. *Am J Trop Med Hyg* 74:953-959.
- 311 21. Henry M, Bordes J, Diallo I, Pradines B, Ka S, Diatta B, Wade B, M'Baye PS, Sane M,
312 Thiam M, Gueye PM, Touze JE, Debonne JM, Rogier C, Fusaï T. 2006. Urban malaria at
313 Dakar, Senegal: Chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum*
314 isolates. *Am J Trop Med Hyg* 75:146-151.
- 315 22. Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Mosnier J, Amalvict R, Benoit N,
316 Torrentino-Madamet M, Pradines B, the French National Reference Centre for imported
317 Malaria Study Group. 2018. Absence of high level of duplication of the *plasmepsin 2* gene
318 in Africa. *Antimicrob Agents Chemother* accepted AAC000374-18.
- 319 23. Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, Ke S, Chy S, Eam R, Khean
320 C, Loch K, Ken M, Lek D, Beghain J, Ariey F, Guerin PJ, Huy R, Mercereau-Puijalon O,
321 Witkowski B, Menard D. 2015. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine
322 failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival
323 rates in novel piperaquine in vitro assays: retrospective and prospective investigations.
324 *BMC Med* 13:305.
- 325 24. Agrawal S, Moser KA, Morton L, Cummings MP, Parihar A, Dwivedi A, Shetty AC,
326 Drabek EF, Jacob CG, Henrich PP, Parotek CM, Jongsakul K, Huy R, Spring MD, Lanteri
327 CA, Chaorattanakawee S, Lon C, Fukuda MM, Saunders DL, Fidoch DA, Lin JT, Juliano
328 JJ, Plowe CV, Silva JC, Takala-Harrison S. 2017. Association of a novel mutation in the
329 *Plasmodium falciparum* chloroquine transporter with decreased piperaquine sensitivity. *J*
330 *Infect Dis* 216:468-476.
- 331 25. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner SF, Mukherjee A, Lim P, Dhorda M,
332 Amaratunga C, Woodrow CJ, Ashley EA, White NJ, Dondorp AM, Fairhurst RM, Ariey
333 F, Menard D, Wirth DF, Volkman SK. 2018. *Plasmepsin II-III* copy number accounts for

- 334 bimodal piperazine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*
335 9:1769.
- 336 26. Pascual A, Madamet M, Briolant S, Gaillard T, Amalvict R, Benoit N, Travers D,
337 Pradines B, the French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group.
338 2015. Multinomial in vitro distribution of *Plasmodium falciparum* susceptibility to
339 piperazine and pyronaridine. *Malar J* 14:49.
- 340 27. Tumwebase P, Conrad MD, Walakira A, LeClair N, Byaruhanga O, Nakazibwe C, Kozak
341 B, Bloome J, Okiring J, Kakuru A, Bigira V, Kapisi J, Legac J, Gut J, Cooper RA, Kanya
342 MR, Havlir DV, Dorsey G, Greehouse B, Nsobya SL, Rosenthal PJ. 2015. Impact of
343 antimalarial treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites
344 isolated from Ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3018-30.
- 345 28. Rasmussen SA, Ceja FG, Conrad MD, Tumwebaze PK, Byaruhanga O, Katairo T,
346 Nsobya SL, Rosenthal PJ, Cooper RA. 2017. Changing antimalarial drug sensitivities in
347 Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01516-17.
- 348 29. Pradines b, Rogier C, Fusai T, Mosnier J, Daries W, Baret E, Parzy D. 2001. In vitro
349 activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron. *Antimicrob*
350 *Agents Chemother* 45:1746-1750.
- 351 30. Briolant S, Parola P, Fusai T, Madamet-Torrentino M, Baret E, Mosnier J, Delmont JP,
352 Parzy D, Minodier P, Rogier C, Pradines B. 2007. Influence of oxygen on asexual blood
353 cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a
354 standardized in vitro assay. *Malar J* 6:44.
- 355 31. Pascual A, Basco LK, Baret E, Amalvict R, Travers D, Rogier C, Pradines B. 2011. Use
356 of the atmospheric generators for capnophilic bacteria Genbag-CO2 for the evaluation of
357 in vitro *Plasmodium falciparum* susceptibility to standard anti-malarial drugs. *Malar J*
358 10:8.

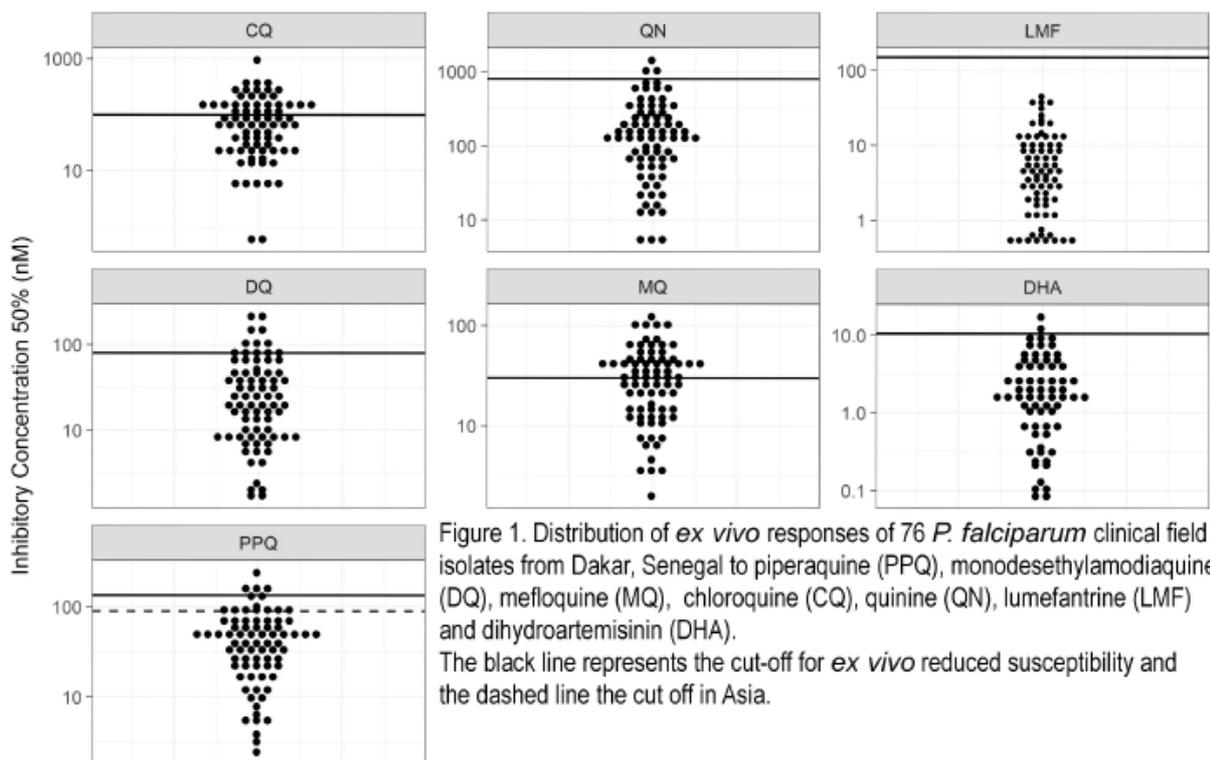
- 359 32. Wein S, Maynadier M, Tran Van Ba C, Cerdan R, Peyrottes S, Fraisse L, Vial H. 2010.
360 Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J Clin*
361 *Microbiol* 48:1651-1660.
- 362 33. Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkman SK,
363 Wirth DF, Legrand E, Fidock DA, Neafsey DE, Musset L. 2015. Adaptive evolution of
364 malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a
365 mutation in *pfcr1*. *Proc Natl Acad Sci* 112:11672–11677.
- 366 34. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kümpornsin K, Takala-Harrison S,
367 Witkowski B, Fairhurst RM, Ariey F, Ménard D, Fidock DA. 2018. Emerging Southeast
368 Asian *Pfcr1* mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line
369 antimalarial piperazine. *Nat Commun* 9:3314.
- 370 35. Madamet M, Kounta MB, Wade KA, Lo G, Diawara S, Fall M, Bercion R, Nakoulima A,
371 Fall KB, Benoit N, Gueye MW, Fall B, Diatta B, Pradines B. 2017. Absence of
372 association between polymorphisms in the K13 gene and the presence of *Plasmodium*
373 *falciparum* parasites at day 3 after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. *Int J*
374 *Antimicrob Agents* 49:754-756.
- 375 36. Smith SJ, Kamara ARY, Sahr F, Samai M, Swaray AS, Menard D, Warsame M. 2018.
376 Efficacy of artemisinin-based combination therapies and prevalence of molecular markers
377 associated with artemisinin, piperazine and sulfadoxine-pyrimethamine resistance in
378 Sierra Leone. *Acta Trop* 185:363-370.
- 379 37. Gupta H, Macete E, Bulu H, Salvador C, Warsame M, Carvalho E, Ménard D, Ringwald
380 P, Bassat Q, Enosse S, Mayor A. 2018. Drug-resistant polymorphisms and copy numbers
381 of *Plasmodium falciparum*, Mozambique, 2015. *Emerg Infect Dis* 24:40-48.
- 382 38. Conrad MD, Mota D, Foster M, Tukwasibwe S, Legac J, Tumwebaze P, Whalen M,
383 Kakuru A, Nayebara E, Havlir DV, Jagannathan P, Huang L, Aweeka F, Kanya MR,

- 384 Dorsey G, Rosenthal PJ. 2017. Impact of intermittent preventive treatment during
385 pregnancy in *Plasmodium falciparum* drug resistance-mediating polymorphisms in
386 Uganda. *J Infect Dis* 216:1008-1017.
- 387 39. Malvy D, Torrentino-Madamet M, L'Ollivier C, Receveur MC, Jeddi F, Delhaes L,
388 Piarroux R, Millet P, Pradines B. 2018. *Plasmodium falciparum* recrudescence two years
389 after treatment of an uncomplicated infection without return to an area where malaria is
390 endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01892-17.
- 391 40. Gendrot M, Fall B, Madamet M, Fall M, Wade KA, Amalvict R, Nakoulima A, Benoit N,
392 Diawara S, Diémé Y, Diatta B, Wade B, Pradines B. 2016. Absence of association
393 between polymorphisms in the RING E3 ubiquitin protein ligase gene and ex vivo
394 susceptibility to conventional antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* isolates from
395 Dakar, Senegal. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5010-5013.
- 396 41. Okombo J, Abdi AI, Kiara SM, Mwai L, Pole L, Sutherland CJ, Nzila A, Ochola-Oyier
397 LI. 2013. Repeat polymorphisms in the low-complexity regions of *Plasmodium*
398 *falciparum* ABC transporters and associations with in vitro antimalarial responses.
399 *Antimicrob Agents Chemother* 57:6196-6204.
- 400 42. Briolant S, Henry M, Oeuveay C, Amalvict R, Baret E, Didillon E, Rogier C, Pradines b.
401 2010. Absence of association between piperazine in vitro responses and polymorphisms
402 in the *pfprt*, *pfmdr1*, *pfmrp*, and *pfhhe* genes in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob*
403 *Agents Chemother* 54:3537-3544.
- 404 43. Pascual A, Madamet M, Bertaux L, Amalvict R, Benoit N, Travers D, Cren J, Taudon N,
405 Rogier C, Parzy D, Pradines B. 2013. In vitro piperazine susceptibility is not associated
406 with the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene. *Malar J* 12:431.

407 Figure 1. Distribution of *ex vivo* responses of 76 *P. falciparum* clinical field isolates from
 408 Dakar, Senegal to piperazine (PPQ), monodesethylamodiaquine (DQ), mefloquine (MQ),
 409 chloroquine (CQ), quinine (QN), lumefantrine (LMF) and dihydroartemisinin (DHA). The
 410 black line represents the cut off for *ex vivo* reduced susceptibility.

411

412 Figure 2. Distribution of the estimated copy numbers of *Pfpm2* according to piperazine
 413 (PPQ) IC₅₀.



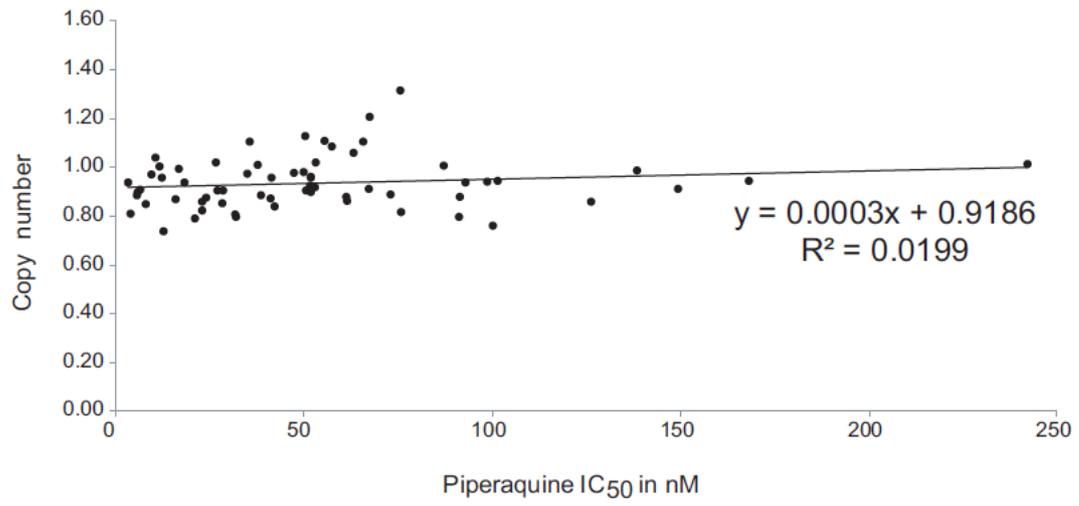


Figure 2. Distribution of the estimated copy numbers of *Pfm2* according to piperaquine (PPQ) IC₅₀



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Marie Gladys ROBERT

IDENTIFICATION ET VALIDATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES
DANS LA DIMINUTION DE SENSIBILITE A LA PIPERAQUINE CHEZ *Plasmodium
falciparum*

RÉSUMÉ :

Le paludisme reste aujourd'hui encore un problème de santé publique majeur. Depuis 2002, l'OMS recommande les combinaisons à base d'artémisinine dans le traitement des accès simples de paludisme à *Plasmodium falciparum*, et notamment la dihydroartémisinine – pipéraquline. Mais des résistances à ces deux molécules émergent dans le sud-est asiatique. Un marqueur moléculaire de résistance aux dérivés de l'artémisinine a récemment pu être mis en évidence. Cette étude a pour objectif d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la diminution de sensibilité à la pipéraquline.

Deux axes ont été abordés : la validation des gènes candidats *Plasmepsin 2*, *Pfpare* et *Pfcarl* sur des isolats africains de *P. falciparum* par une étude d'association phénotype-génotype, et la mise en place d'un protocole de culture sous pression de pipéraquline en vue d'induire une résistance sur un clone de laboratoire initialement sensible, et d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance à la pipéraquline en étudiant le génome de ce clone résistant.

Nos résultats montrent l'absence d'implication des candidats marqueurs dans la réduction de sensibilité à la pipéraquline d'isolats africains. La recherche de nouveaux marqueurs moléculaires est donc nécessaire sur la base de cette étude, et la culture sous pression de pipéraquline pourrait être un moyen d'atteindre cet objectif.

MOTS CLÉS : Paludisme, résistance, pipéraquline, marqueurs moléculaires, *Plasmepsin2*

FILIÈRE : Biologie médicale