



HAL
open science

Évolution des résistances à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine, et analyse de la complexité des infections à *Plasmodium falciparum*, Welch (1897) dans quatre localités en Côte d'Ivoire

Aristide Bérenger Ako Ako

► **To cite this version:**

Aristide Bérenger Ako Ako. Évolution des résistances à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine, et analyse de la complexité des infections à *Plasmodium falciparum*, Welch (1897) dans quatre localités en Côte d'Ivoire. Parasitologie. Université Félix Houphouët-Boigny Abidjan (Côte d'Ivoire), 2014. Français. NNT: . tel-02885141

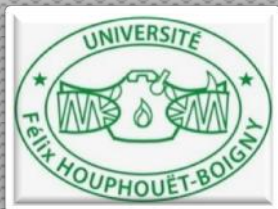
HAL Id: tel-02885141

<https://hal.science/tel-02885141>

Submitted on 30 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de Génétique

Année Universitaire
2013-2014

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité : Génétique et amélioration des espèces animales

Numéro d'ordre
853/2014

M. AKO Ako Aristide Bérenger

**EVOLUTION DES RESISTANCES A LA
SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE ET A LA
CHLOROQUINE, ET ANALYSE DE LA COMPLEXITE
DES INFECTIONS A *PLASMODIUM FALCIPARUM*,
WELCH (1897) DANS QUATRE LOCALITES EN
COTE D'IVOIRE**

Soutenu publiquement
le 15 février 2014

Commission du jury

M. TIO TOURE Bakary	Professeur titulaire (UFHB) Président
M. NGUETTA Assanvo Simon-Pierre	Professeur titulaire (UFHB) Directeur
M. NGORAN Kouakou Eliézer	Professeur titulaire (UFHB) Rapporteur
Mme Carol Hopkins SIBLEY	Professeur titulaire (UW, Seattle, USA) Examinatrice
M. AHONZO-NIAMKE Sébastien	Professeur titulaire (UFHB) Examineur
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur titulaire (UFHB) Examineur

DEDICACES

A mon Dieu,

Voici le fruit des efforts fournis à la mesure des talents que Tu as daignés m'accorder et des nombreuses grâces liés à ce travail, signes de ta grande miséricorde en ma faveur! Puisses-Tu accepter l'humble expression de ma gratitude pour Ton incommensurable bonté.

A mon père, de vénéré mémoire

J'aurais bien aimé t'exprimer de vive voix mon infinie reconnaissance pour les nombreux sacrifices que maman et toi avez consentis au cours de mes études. Hélas, je ne le puis guère à présent, du moins en partie. Puisque tu peux désormais entendre le silence de mon for intérieur, aussi réaliseras-tu aisément l'exultation ineffable et la profondeur de l'émotion qui m'étreignent à l'évocation de ton souvenir. Merci papa !

A ma mère,

Comme la discrète sainte Monique, tu demeures celle à qui je recours quand la vie me joue des tours inextricables, mais pas seulement ! Malgré le cours parfois tumultueux de mon parcours d'étudiant qui s'achève allègrement, tu as su croire jusqu'au bout en ma modeste personne et m'accorder ta confiance comme papa. Puisse Marie, la Médiatrice de Toutes Grâces te quérir des grâces en surabondance et au-delà même de tes espérances.

A mes sœurs et frères,

Je n'aurais bénéficié de votre grande complicité que je ne serai à cette étape. Je vous prie de bien vouloir considérer ce travail comme le vôtre. Il résulte en partie de vos modestes contributions individuelles sous forme de pertinentes questions désintéressées inspirées par la curieuse « histoire » contée dans ce mémoire de thèse. Merci pour vos prières persévérantes et pour l'égard que vous ne cessez de me témoigner...

A ma fiancée CHRISTIANE,

Pour toutes les marques d'affection qui se sont épanchées de ton cœur, pour tes prières discrètes et pour les maints sacrifices auxquels tu as dû consentir pendant toutes ces longues années, que Notre Dame des Victoires continue de t'assister tous les jours de ta vie!

A Alex Gilles PAKORA,

Pour l'opportunité de concourir pour une bourse doctorale que tu m'as offerte, pour ta spontanéité généreuse sans rien attendre en retour. Je n'en serais peut être pas là sans toi!

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas eu le jour sans l'appui scientifique, technique et financier de plusieurs institutions auxquelles je voudrais exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie avant tout l'Université de Washington (UW, Etats-Unis d'Amérique) qui, par l'entremise du doyen du Département des Sciences du Génome de la faculté de médecine, a bien voulu accepter que mon initiation à la recherche en épidémiologie moléculaire du paludisme passe par l'institution dont il a la charge.

J'exprime ma reconnaissance à l'endroit de l'Université de Maryland à Baltimore (MA, Etats-Unis d'Amérique) qui m'a accueilli en tant que boursier du programme RS McNamara de la Banque Mondiale afin de bénéficier de l'appui scientifique et technique de l'Institut Médical Howard Hughes du CVD sis à la Faculté de Médecine de ladite université.

Je remercie aussi l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), avec à sa tête madame **Mireille BRETIN-DOSSO**, Professeur Titulaire de Microbiologie à la Faculté de Médecine de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (UFHB) qui n'a ménagé aucun effort pour faire de cet institut un pôle Ouest-africain de référence en matière de recherches scientifique et biomédicale. Merci de m'avoir donné l'opportunité de bénéficier de votre plateau technique tout en acceptant de m'accueillir au sein de votre illustre institution dans le cadre de cette thèse.

Je tiens à remercier enfin le Professeur **Paul Essetchi KOUAMELAN**, Directeur de l'UFR Biosciences (UFHB) qui a bien voulu accepter mon inscription en thèse au sein de son établissement et faciliter la participation du professeur Carol Hopkins SIBLEY à mon jury de thèse.

Je voudrais exprimer mon infinie reconnaissance à mes maîtres sans les contributions desquels ce travail n'aurait pas eu la qualité scientifique qui en autorise la soutenance publique.

Je remercie monsieur le Professeur **Simon-Pierre Assanvo NGUETTA**, Professeur Titulaire des Sciences Biologiques et Agronomiques - spécialité génétique, amélioration des plantes et statistiques, Directeur du Laboratoire de Génétique (UFHB). La rigueur, le souci du détail, l'esprit d'ouverture, et l'humilité dont vous avez fait preuve au cours de votre supervision me convainquent de votre grandeur d'âme et de votre culture scientifique. J'ai toujours reçu de vous une attention particulière quand j'en exprimais le besoin. Merci pour vos conseils et nombreux mots d'encouragement, pour la collaboration soutenue entre le Laboratoire de Génétique et l'IPCI grâce à laquelle ce travail a été initié.

Je remercie monsieur le Docteur **Louis Koné PENALI**, Chargé de Recherches, ex Chef de l'Unité de Paludologie de l'IPCI, actuel Directeur du WWARN/Afrique de l'Ouest et co-directeur

de thèse. Merci de m’avoir accueilli dans votre laboratoire pour m’apprendre les fondamentaux de la Paludologie. Vous avez suscité ce travail au cours des échanges que nous avons sur une approche génétique de la question de la résistance aux antipaludiques. Merci aussi pour le suivi permanent que vous avez su assurer en dépit de vos nombreuses sollicitations nationales et internationales dues à votre expertise dans le domaine de la Paludologie.

Je dis merci à monsieur le Docteur **Offianan André TOURE**, Chargé de Recherches, actuel chef de l’Unité de Paludologie et Directeur par intérim du Département de Parasitologie-Mycologie-Paludologie de l’IPCI. Sous l’égide du Dr PENALI, vous avez été l’acteur principal de mon initiation à la Paludologie, sous vos auspices a grandi une passion pour la recherche dans ce domaine. Vous avez aidé à la réalisation de ce travail tout en m’exposant au niveau de la recherche internationale avec l’appui de Carol SIBLEY. Cher maître, merci du fond du cœur pour le savoir et le savoir-faire partagés et pour votre soutien permanent dans toutes les épreuves que j’ai traversées.

Je remercie aussi madame le Professeur **Carol Hopkins SIBLEY**, Professeur Titulaire des Sciences du Génome et ex Directrice du Laboratoire de Génétique du Paludisme à l’Université de Washington (UW, Etats-Unis d’Amérique) et actuelle Directrice Scientifique du WWARN. Plus qu’un superviseur discret, « *shadow supervisor* », vous représentez pour moi le grand maître et mentor que je n’ai jamais eu, le lien idoine entre la génétique à laquelle j’ai été initié à l’Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY et la paludologie à laquelle je dois mon passage à l’IPCI. Vous m’avez donné l’opportunité de réaliser l’analyse moléculaire des gènes de résistance à partir du séquençage conventionnel. Je suis très honoré et fier que vous puissiez me compter dans le cercle éclectique de vos proches collaborateurs au point de faire le déplacement de Seattle (USA) à Abidjan pour participer à ma thèse. Recevez mes sincères remerciements pour l’encadrement scientifique et technique que je continue de bénéficier à vos côtés. Ces remerciements vont aussi à l’endroit de **Marnie JOHANSSON**, votre assistante de recherche, et aux Docteurs **Marie-Solange Evehe BEBEMDOUE**, **Laura K. CERTAINS** et **Viviane HAWKINS**, vos élèves, pour l’appui technique qu’elles ont bien voulu m’accorder au cours de mon séjour au sein de votre laboratoire.

Je remercie par la même occasion monsieur le Docteur **Christopher Vine PLOWE**, Directeur de Recherches, directeur du groupe “Paludisme” au CVD et Investigateur Principal de l’Institut Médical Howard Hughes de la Faculté de Médecine de l’Université de Maryland à Baltimore (MA, USA). Vous n’avez pas hésité un seul instant à m’exprimer votre joie de m’accueillir au sein de l’équipe que vous dirigez lorsque le professeur Carol SIBLEY nous mîmes en contact. Par vos excellentes qualités de chercheur sénior, vous avez su me guider à rendre plus pertinentes mes

questions de recherche et à choisir les méthodes les mieux appropriées pour mes travaux. J'ai ainsi appris à utiliser les microsattellites et à m'accoutumer au Pyroséquençage. Merci aussi à vos collaborateurs dont les Docteurs **Shannon Takala HARISSON** pour les acquis en statistique et épidémiologie moléculaire, et **Leo KENEFIC** pour la communication scientifique, et à vos assistants de recherches **David ANACKER** (extraction d'ADN à l'aide du *BioRobot*), **Li CHENG** (analyse des microsattellites à l'aide du logiciel *GeneMapper*), **Malathi VLADNA** (Pyroséquençage).

Aux honorables membres du jury

Je remercie monsieur le Professeur **Bakary TIO-TOURE**, Professeur Titulaire de Génétique à la retraite, ex Directeur du Laboratoire de Génétique et ex Recteur de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY. C'est un grand honneur pour moi que vous acceptiez de présider mon jury de thèse et d'apporter votre appréciation à la modeste contribution qu'est cette thèse. Très cher grand maître, veuillez agréer l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie monsieur le Professeur **Joseph Allico DJAMAN**, Professeur Titulaire Biochimie-Parasitologie, directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences (UFHB), et Directeur du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vous êtes l'un des maîtres dont la simplicité, l'ouverture d'esprit et la riche carrière scientifique représentent pour moi un modèle d'inspiration. Vos remarques pertinentes m'ont permis d'améliorer le fond et la forme de mon manuscrit de thèse. Je suis d'autant plus honoré que vous acceptez de prendre part au jury de thèse. Pour l'intérêt « naturel » porté à ce travail, je vous suis particulièrement reconnaissant. Merci de vos importantes questions, remarques et commentaires qui ont permis de mettre en valeur ce travail.

Je remercie monsieur le Professeur **Arsène Irié ZORO-BI**, Professeur Titulaire de Génétique, Directeur du Laboratoire de Génétique de l'Université Nangui Abrogoua (UNA). Toute ma reconnaissance pour vos critiques et commentaires dont vous avez fait preuve lors du jugement de ce travail, surtout ceux relatifs à la pertinence des tests statistiques utilisés dans ce travail.

Je remercie monsieur le Professeur **Eliézer Kouakou NGORAN**, Professeur Titulaire de Parasitologie et Directeur du Laboratoire de Zoologie et de Biologie Animale (UFHB). Je vous prie d'agréer ces remerciements sincères pour avoir accepté d'instruire la thèse et de me faire honneur en participant à mon jury. Vos critiques et remarques ont permis de renforcer certains aspects clés du manuscrit.

Je remercie monsieur le Professeur **Sébastien L. AHONZO-NIAMKE**, Professeur Titulaire de Biochimie, Vice-Doyen chargé de la Recherche de l'UFR Biosciences. Je vous dis sincèrement merci de votre disponibilité et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de participer au

jury de thèse en remplacement du Professeur ZORO-BI Irié Arsène, empêché. Vos remarques pertinentes m'ont permis d'apporter une grande amélioration à la forme du document.

A mes enseignants

Je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour les modèles que vous avez été par vos talents respectifs de maître.

Je remercie messieurs les Docteurs **AHOUSSOU Koffi**, ex Maître-assistant et ex Directeur du Laboratoire de Génétique et **LIDAH Yéhili Justin**, ex-Assistant, de vénérés mémoires. Vos contributions à la formation des étudiants inscrits en génétique et à l'amélioration des ressources végétales auraient été plus grandes aujourd'hui ! Vous êtes parti si tôt...

Ces remerciements vont à l'endroit des Docteurs **YAPI-GNAORE C.V.**, Directrice de Recherches, anciennement professeure de génétique quantitative et actuelle Directrice du Centre International de Recherche - Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES) ; **SANGARE A.**, Directeur de Recherches, anciennement professeur de biologie moléculaire et ingénierie génétique et actuellement manager du Programme de Biotechnologie et de Biosécurité au Conseil d'Afrique de l'Ouest et du Centre pour la Recherche et le Développement Agricole (CORAF/WECARD) ; **DOANNIO Julien M.C.**, Directeur de Recherches, anciennement professeur de biologie des populations de vecteurs des maladies tropicales et actuel Directeur du Laboratoire d'Entomologie Médicale de l'Institut National de la Santé Publique (INSP).

Je n'oublie pas les Docteurs **ALLA-N'NAN O.**, **GNANGBE F.**, **KOUASSI A.**, **LOLO O. M.**, **TIECOURA K.**, **COULIBALY H. F.**, **ALLOU D.**, **COULIBALY M.**, **TOURE M.**, **KOUASSI A. B.**, **OKOMA K. M.**, **SOKOURI D.**, **TIAN-BI Y. N.**

A messieurs

Le Docteur **COULIBALY M. Yahya**, Maître de Recherches à la retraite, pour vos conseils et encouragements. Remerciements et infinie gratitude pour avoir contribué à améliorer la première version du manuscrit de thèse.

Le Professeur **YAVO William**, Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de Pharmacie (UFHB) et Directeur du Centre de Recherche et de Lutte contre le Paludisme de l'INSP. Merci pour les entretiens que vous avez bien voulu m'accorder et pour vos contributions à l'amélioration de la qualité du manuscrit.

Le Docteur **BEOUROU Sylvain**, Attaché de Recherches, chef-adjoint de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. J'ai bénéficié de vos conseils et de vos mots d'encouragement pendant la phase de rédaction de mon manuscrit de thèse, phase considérée comme étant la plus difficile. Merci pour le temps que vous avez daigné m'accorder.

Je suis heureux d'avoir collaboré avec les ingénieurs du Département de Parasitologie-Mycologie-Paludologie, madame **SYLLA née THANON Karidja**, messieurs **ISSIAKA Bassinka**, **ADAMA Soumahoro**, **MOBIO Simon-Pierre** retraité.

Je remercie, pour leur grande sollicitude et pour l'aide supplémentaire accordée pendant la phase d'analyse statistique de mes données, messieurs les Docteurs **AHOUSSE Serge**, Chargé de Recherches à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) et **TAPE Joanny**, Chargé de Recherches au Centre de Recherches Océanographiques (CRO).

Monsieur **HIE Martin**, Secrétaire Principal à l'UFR Biosciences, je n'oublierai jamais les mots d'encouragement que vous m'avez adressés au moment où, l'abandon des études universitaires me hantait. C'est aussi grâce à vous si j'ai su toujours regarder à mon but.

A mes amis et collègues

Je ne vous remercierai jamais assez pour l'implication personnelle, la motivation, le soutien spirituel, moral et matériel apporté. Puisse Dieu, dans sa grande miséricorde, se souvenir toujours de vous.

Messieurs **GBESSI E. A.**, **KOFFI D.**, **COULIBALY B.**, **TUO K.**, **YAO S.S.**, doctorants à l'Unité de Paludologie de l'IPCI ; **N'GUESSAN T.L.** et **COULIBALY M.A.A.**, médecins ayant effectué leur stage doctoral à l'Unité de Paludologie ; mesdemoiselles **DION Y.B.** et **COULIBALY A.F.**, messieurs **SEVEGNON G.M.**, **KOBENA K.K.** et **DIE H.**, techniciens associés à l'Unité de Paludologie.

Mademoiselle **SASSA A.**, messieurs **ABOA D.** et madame, **ADJI K. S. D.** et madame, **ASSI H.**, **ATSE N.**, **KOUAKOU C.**, **SERI J-P**, **TEHOUA H. A.**, monsieur et madame **N'GUESSAN A.**, à la **Société de Marie** en Côte d'Ivoire et plus particulièrement aux pères **Léo PAUELS**, **YAPI A. M.**, **NANA F.**, **OKOIN Ndja Pierre**, **ADINGRA Eugène**, **AKOBE Noël-Dominique**, **GBEZE Georges**, aux frères **KANHOU Jérôme Didier**, **SERI Claude Gérard**, **SINZUGU Dieudonné**, aux **Jeunes Fraternités Marianistes** dont je fus le président national de 1998 à 2003, au Comité d'Organisation du Rassemblement des Mouvements Marial de Jeunes du Diocèse d'Abidjan dont j'ai été le Coordonateur de 2003 à 2006.

Pour le soutien spirituel, moral et financier, j'adresse des remerciements spéciaux à :

Monsieur et madame **BESSIKE Baudouin**,

Monsieur et madame **CAMARA Alexis**,

Monsieur et madame **ABOBI Séverin**,

Monsieur et madame **PENALI Louis**,

Monsieur et madame **GNABA Salomon**.

AVANT-PROPOS

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du programme de recherche portant sur l'étude des chimiorésistances de l'Unité de Paludologie de l'IPCI. Malgré le retrait officiel de la chloroquine (CQ) et de la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) dans la prise en charge du paludisme simple, ces médicaments ont connu une utilisation prolongée et abusive depuis leur introduction en Côte d'Ivoire. L'étude a été entreprise dans le but d'élucider l'impact de la pression médicamenteuse, la mobilité des personnes, et du faciès épidémiologique sur l'évolution des résistances à la SP et CQ en Côte d'Ivoire.

Pour cette étude, des échantillons ont été collectés auprès d'enfants asymptomatiques et d'individus symptomatiques. La collecte des échantillons a été réalisée dans quatre localités réparties sur deux faciès épidémiologiques de Côte d'Ivoire : le faciès équatorial au Sud et le faciès tropical au Nord. Les échantillons collectés ont été organisés et conservés à l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) avant la réalisation des tests moléculaires dans deux laboratoires d'accueil aux Etats-Unis d'Amérique. En effet, en plus de l'isolement de l'ADN de *Plasmodium falciparum*, deux types d'expérimentations ont été réalisées dans les institutions de recherches qui suivent :

- le Laboratoire d'Epidémiologie Génétique du Paludisme de l'Université de Washington à Seattle (WA, Etats-Unis d'Amérique) où le séquençage conventionnel a été réalisé.
- l'Institut Médical Howard Hughes du Groupe de Recherche sur le Paludisme du Centre de Développement des Vaccins de l'Université de Maryland à Baltimore (MA, Etats-Unis d'Amérique) a servi de cadre pour le Pyroséquençage.

Au terme des travaux, il est apparu que la diversité génétique des marqueurs moléculaires de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine est semblable pour des populations de parasites issues du même faciès épidémiologique. La prédominance du marqueur moléculaire Gly-437 de résistance à la sulfadoxine au sein de la population étudiée, la prédominance de parasites portant les allèles sensibles à la SP et CQ dans la localité du Nord et la persistance de parasites *Plasmodium falciparum* portant la résistance à la SP et de la CQ depuis 2002 à Anonkoua-kouté ont pu être mises en évidence.

Une surveillance des niveaux de résistance à la SP et CQ pourrait permettre de préserver l'efficacité de la SP actuellement recommandée en prophylaxie chez la femme enceinte. Les autorités et les instances de décisions devraient mettre des moyens conséquents à la disposition des chercheurs à cet effet.

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
AVANT-PROPOS	VII
SOMMAIRE	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	XII
INTRODUCTION.....	1
I. CONSIDERATIONS GENERALES	5
1.1 - PALUDISME EN COTE D'IVOIRE.....	5
1.2 - ESPECES PLASMODIALES INFECTANT L'HOMME.....	5
1.3 - TAXINOMIE DES ESPECES PLASMODIALES INFECTANT L'HOMME.....	7
1.4 - CYCLE BIOLOGIQUE DE DEVELOPPEMENT DE <i>PLASMODIUM</i>	8
1.4.1 - Cycle chez l'Homme, l'hôte vertébré	8
1.4.2- Cycle chez le moustique	11
1.5 - COMPLEXITE DES INFECTIONS A <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	11
1.6 -ANTIPALUDIQUES	12
1.6.1 - Antipaludiques classiques	12
1.6.2 - Artémisinine et dérivés	12
1.6.3 - Amino-2-alcools	13
1.6.4 - Amino-4-quinoléines	14
1.6.5 - Antifoliniques et antifoliques	14
1.7 - QUELQUES ANTIPALUDIQUES DE NOUVELLE GENERATION	15
1.7.1 - Antipaludiques en développement.....	15
1.7.2 - Quelques molécules en optimisation.....	16
1.8 -RESISTANCE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> AUX ANTIPALUDIQUES	16
1.8.1- Définition de la notion de résistance aux antipaludiques.....	16
1.8.2 - Historique de l'émergence et de la propagation des résistances	16
1.8.3 - Facteurs favorisant l'émergence et l'extension de la résistance aux antipaludiques	22
1.9 -METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE DES ANTIPALUDIQUES	24
1.9.1 - Test d'efficacité thérapeutique	24
1.9.2 - Tests de chimiosensibilité	24
1.9.3 - Tests moléculaires	25
1.10 -ANALYSE DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE RESISTANCES	34
1.10.1 - Séquençage par hybridation	34
1.10.2 - Méthodes de génotypage en basse technologie	34
1.10.3 - Cas du pyroséquençage	34
II. MATERIEL ET METHODES	39

2.1 - MATERIEL	39
2.1.1 - Sites d'étude	39
2.1.2 - Populations et périodes d'étude	40
2.1.3 - Gènes étudiés	45
2.1.4 - Microsatellites analysés	45
2.1.5 - Questions éthiques et réglementaires	45
2.2 - METHODES	48
2.2.1 - Collecte et conservation des échantillons	48
2.2.2 - Découpage des spots de papier filtre et plans de microplaque	50
2.2.3 - Isolement de l'ADN génomique de <i>Plasmodium falciparum</i>	50
2.2.4 - Séquençage conventionnel	54
2.2.5 - Pyroséquençage	60
2.2.6 - Polymorphisme de la longueur des microsatellites	70
2.2.7 - Analyses statistiques	75
III. RESULTATS ET DISCUSSION	77
3.1 - RESULTATS	77
3.1.1 - Polymorphisme de la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine d'isolats d'enfants asymptomatiques et de patients symptomatiques vivant à Anonkoua-kouté	77
Conclusion partielle	82
3.1.2 - Analyse moléculaire des marqueurs conférant la résistance à la Sulfadoxine- pyriméthamine et à la Chloroquine à Bonoua et Samo	82
Conclusion partielle	90
3.1.3 - Bilan des analyses effectuées par pyroséquençage	90
3.1.4 - Répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine	90
Conclusion partielle	99
3.1.5 - Evolution des marqueurs moléculaires de résistance à la Sulfadoxine- pyriméthamine et à la Chloroquine à Anonkoua-kouté de 2002 à 2008	99
Conclusion partielle	108
3.1.6 - Complexité des infections à <i>Plasmodium falciparum</i> à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala	112
Conclusion partielle	115
3.2. DISCUSSION	118
CONCLUSION GENERALE	133
PERSPECTIVES	135
RECOMMANDATIONS	135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137
ANNEXES	164

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléotide
AL	Artéméther-luméfantrine
APS	Adénosine 5 'phosphosulfate
AQ	Amodiaquine
ASAQ	Artésunate-Amodiaquine
ASO	Oligonucléotide allèle-spécifique
ATL	<i>Tissue lysis buffer</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AW	<i>Washing buffer</i>
BET	Bromure d'éthidium
CA	Californie
CCD	Dispositif à couplage de charge
CI50	Concentration inhibitrice 50 %
CK	Cellules de Kupffer
CQ	Chloroquine
CQR	Chloroquinorésistant
CSP	<i>Circumsporozoït surface protein</i>
CTA	Combinaisons thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine
CVD	<i>Center for Vaccine Development</i>
dATP- α S	Désoxyadénosine alpha-thio triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanine triphosphate
DL	Déséquilibre de liaison
DNA Pol	<i>DNA Polymerase</i>
dNTP	Désoxynucléosine triphosphate
dTMP	Désoxythymidine monophosphate
DTT	Dithiothréitol
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbant assay</i>
FSUCOM	Formation sanitaire urbaine à base communautaire
GE/FS	Goutte épaisse et de frottis sanguin
HRP	<i>Histidine Rich Protein</i>
IC 95 %	Intervalle de confiance 95 %
MA	Maryland
min	Minute
mM	Milimolaire
MR4	<i>Malaria research and reference reagent resource center</i>
MS	Microsatellite

MSP	<i>Merozoit surface protein</i>
ng	Nanogramme
NJ	<i>New Jersey</i>
nM	Nanomolaire
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>pfcr</i>	Gène de la <i>chloroquine résistance transporter</i>
PfCRT	Protéine de <i>chloroquine résistance transporter</i>
<i>pfdhfr</i>	Gène de la dihydrofolate réductase - thymidilate synthétase
PfDHFR-TS	Enzyme de la dihydrofolate réductase - thymidilate synthétase
<i>pfdhps</i>	Gène de la dihydroptéroate synthétase
PfDHPS	Enzyme dihydroptéroate synthétase
PfLDH	Enzyme de la lactate déshydrogénase
<i>pfmdr</i>	<i>Multidrug résistance</i>
<i>pfnhe</i>	Gène de la protéine d'échange et de transport du couple Na ⁺ /H ⁺
PfNHE	Protéine d'échange et de transport du couple Na ⁺ /H ⁺
PfSHMT	Serine hydroxyméthyl transférase
PNLP	Programme national de lutte contre le paludisme
PNC	<i>Primary negative control</i>
PPi	Pyrophosphate inorganique
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
SNC	<i>Secondary negative control</i>
SNP	Polymorphisme de nucléotide unique
SP	Sulfadoxine-pyriméthamine
TBE	Tris-Borate EDTA
TPI	Traitement préventif intermittent
TS	Triméthoprim-sulfaméthoxazole
<i>ubp</i>	Gène de l'enzyme de-ubiquitination
UFHB	Université Félix Houphouët-Boigny
UNA	Université Nangui Abrogoua
UV	Ultra Violet
UW	<i>University of Washington</i>
VA	Virginia
VIH/SIDA	Virus de l'Immunodéficience Humaine/Syndrome de l'Immunodéficience Acquis
WHO	Organisation mondiale de la santé (<i>World Health Organization</i>)
WWARN	Réseau mondiale de la résistance aux antipaludiques (<i>Worldwide Antimalarial Résistance Network</i>)

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1.	Prévalence de <i>P. falciparum</i> en Côte d'Ivoire.....	6
Figure 2.	Cycle de vie de <i>Plasmodium spp.</i>	10
Figure 3.	Biosynthèse des folates chez <i>Plasmodium spp.</i> ,	17
Figure 4.	Topologie et fonction de la PfCRT.....	32
Figure 5.	Prévalence du triple mutant <i>pfdhfr</i> (N51I, C59R, S108N) en Afrique.....	35
Figure 6.	Prévalence du double mutant <i>pfdhps</i> (A437G, K540E) en Afrique.....	36
Figure 7.	Carte présentant la localisation des sites d'étude.....	41
Figure 8.	Confetti de papier filtre <i>Whatman 3 MM</i>	49
Figure 9.	Procédure d'extraction QIAamp par centrifugations.....	52
Figure 10.	Étapes pour l'extraction de l'ADN génomique au <i>BioRobot</i>	55
Figure 11.	Électrophorégramme de la microplaque n°1 pour le gène <i>pfCRT</i> réalisé avec l'automate QIAxel (Qiagen, Valencia, CA).	65
Figure 12.	Pyrogramme correspondant au puits F12 de la microplaque 14 DHPS 436/437 R 032410.....	71
Figure 13.	Pyrogramme correspondant au puits A10 de la microplaque P15 CRT 76 Repeat 042110.....	72

Liste des tableaux

Tableau I.	Echantillons utilisés dans l'analyse moléculaires des marqueurs de la résistance à la SP et à la CQ à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo.	42
Tableau II.	Echantillons utilisés pour l'étude de la répartition géographique et de la dynamique des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ en Côte d'Ivoire au cours de la période 2002-2008.	44
Tableau III.	Périodes de collecte, sites d'étude et taille des échantillons.	46
Tableau IV.	Séquences des amorces de microsattellites utilisées en mono-injection.	47
Tableau V.	Séquences des amorces utilisées au cours de la PCR et du séquençage de l'ADN extrait d'isolat issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008.	56
Tableau VI.	Amorces utilisées pour les amplifications primaires par PCR et secondaires par nested-PCR.	61
Tableau VII.	Amorces de pyroséquençage.	62
Tableau VIII.	Variations de simple base au sein de séquences codantes d'acides aminés.	63
Tableau IX.	Volumes respectifs d'enzyme, de substrat et de nucléotides nécessaires pour la réaction de pyroséquençage pour 100 échantillons.	69
Tableau X.	Bilan du séquençage de l'ADN extrait d'isolats issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008 en fonction des loci.	78
Tableau XI.	Distribution des allèles des gènes <i>pf dhfr</i> , <i>pf dhps</i> et <i>pf crt</i> au sein d'isolats issus des individus symptomatiques et asymptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008.	80
Tableau XII.	Distribution des génotypes des gènes <i>pf dhfr</i> , <i>pf dhps</i> et <i>pf crt</i> au sein d'isolats issus des individus symptomatiques et asymptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008.	81
Tableau XIII.	Allèles <i>pf dhfr/pf dhps</i> mis en évidence en 2008 à Anonkoua-kouté en Côte d'Ivoire.	83
Tableau XIV.	Allèles <i>pf dhfr/pf dhps</i> mis en évidence en 2008 à Anonkoua-kouté en Côte d'Ivoire.	84
Tableau XV.	Bilan de séquençage de l'ADN des isolats collectés à Bonoua et à Samo en 2005 en Côte d'Ivoire.	86

Tableau XVI.	Distribution des allèles des gènes <i>pf dhfr</i> , <i>pf dhps</i> et <i>pf crt</i> portés par des isolats issus de symptomatiques venus de Bonoua et Samo en 2005.....	87
Tableau XVII.	Distribution des génotypes des gènes <i>pf dhfr</i> , <i>pf dhps</i> et <i>pf crt</i> portés par des isolats issus symptomatiques venus de Samo et Bonoua.	89
Tableau XVIII.	Fréquences cumulées des génotypes et des génotypes mixtes à Bonoua et Samo en 2005.	91
Tableau XIX.	Répartition des allèles du gène <i>pf dhfr</i> à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009	93
Tableau XX.	Répartition des allèles du gène <i>pf dhps</i> à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009	94
Tableau XXI.	Répartition des allèles du gène <i>pf crt</i> à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009.	96
Tableau XXII.	Répartition des haplotypes du gène <i>pf dhfr</i> à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala en 2008-2009.....	97
Tableau XXIII.	Répartition des haplotypes du gène <i>pf dhps</i> à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala en 2008-2009 en Côte d’Ivoire.	98
Tableau XXIV.	Répartition des haplotypes du gène <i>pf crt</i> à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala en 2008-2009 en Côte d’Ivoire.	100
Tableau XXV.	Dynamique des allèles combinés (mixtes et mutants) des gènes <i>pf dhfr</i> , <i>pf dhps</i> , <i>pf crt</i> à Anonkoua-kouté de 2002 à 2008.....	101
Tableau XXVI.	Dynamique des allèles du gène <i>pf dhfr</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.	104
Tableau XXVII.	Dynamique des allèles du gène <i>pf dhps</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.	106
Tableau XXVIII.	Dynamique des allèles du gène <i>pf crt</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.	107
Tableau XXIX.	Dynamique des génotypes du gène <i>pf dhfr</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.....	109
Tableau XXX.	Dynamique des génotypes du gène <i>pf dhps</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.....	110
Tableau XXXI.	Dynamique des génotypes du gène <i>pf crt</i> à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.	111

Tableau XXXII. Tailles de référence des allèles microsatellite des isolats de <i>P. falciparum</i> HB3 et 3D7.....	113
Tableau XXXIII. Taille des allèles microsatellites par année et par site d'étude.....	114
Tableau XXXIV. Nombre d'allèles microsatellites par infections à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala.	116
Tableau XXXV. Nombre minimum de parasites par infection multiple par année et par site d'étude.	117

INTRODUCTION

Le paludisme (du latin *palus*, « marais ») ou malaria (de l'italien *mal aria* «mauvais air») est une érythrocytopathie due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle infectée (Gentilini, 1993). *Plasmodium falciparum*, responsable de la plus grande partie de la létalité attribuable au paludisme, est la plus virulente des cinq espèces plasmodiales qui infectent l'Homme (Vythilingam, 2010).

L'infection cause près d'un million de décès dans le monde avec une baisse de 1,3 % du produit intérieur brute dans les pays endémiques. Environ la moitié de la population mondiale est à risque. Les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes, les personnes vivant avec le VIH/SIDA, les voyageurs vivant dans les pays non endémiques et revenant des pays endémiques en sont les cibles privilégiées (WHO, 2010). Grâce aux fonds d'origine internationale consacrés à la lutte contre le paludisme, le nombre de cas de paludisme a baissé de 244 000 000 en 2005, à 225 000 000 de cas en 2009 (Katz *et al.*, 2011). Le nombre de décès imputables à l'érythrocytopathie a reculé également de 985 000 en 2000, à 781 000 en 2009. En Afrique, un enfant subit en moyenne 1,6 à 5,4 épisodes de fièvre palustre et environ 200 000 enfants et 10 000 femmes enceintes meurent de paludisme chaque année (WHO, 2010).

En Côte d'Ivoire, le paludisme sévit dans toutes les régions à l'état hyperendémique. Environ 1,8 millions de cas ont été dénombrés, 33 000 hospitalisations et 18 000 décès (WHO, 2009). Toute la population du pays est à risque, soit 21 millions de personnes. Le paludisme est la principale raison d'admission dans les hôpitaux et la principale cause de mortalité des enfants de moins de cinq ans enregistrée dans les services sanitaires ruraux (Anonyme-2, 2008). La prévalence nationale du paludisme est de 18,1 % parmi les enfants de 6 à 59 mois et de 7 % chez les femmes enceintes (Anonyme-4, 2012).

La résistance constitue un obstacle majeur à la prise en charge du paludisme. Les premières études sur la pharmacorésistance de *P. falciparum* en Côte d'Ivoire ont été réalisées dans les régions de Buyo en 1984 (Douchet *et al.*, 1984) et d'Adzopé en 1986 (Anonyme-1, 1986). Elles ont mis en évidence les premiers cas de chloroquinorésistance (CQR) confirmés *in vitro* en 1987 (Nicoulet *et al.*, 1987; Charmot, 1988). Moins de deux décennies plus tard, les échecs à la chloroquine (CQ) se sont accrus et étendus à l'ensemble du territoire national (Penali *et al.*, 1990). La CQ est restée la molécule la plus importante dans la prise en charge du paludisme simple jusqu'en 2003 (Anonyme-2, 2008) grâce à sa très bonne compliance, à son innocuité et à sa bonne tolérance (Basco *et al.*, 1998).

Aujourd'hui, elle ne l'est plus officiellement à cause de niveaux élevés de résistance rapportés dans le pays et ailleurs en Afrique subsaharienne (White, 2004). Le niveau de la chloroquino-

résistance est resté préoccupant avec plus de 60 % des échecs thérapeutiques à la CQ ([Menan et al., 2007](#)), une concentration inhibitrice à 50 % (CI50) de 225 nM contre 47 nM pour les isolats sensibles ([Touré et al., 2008](#)) et une prévalence des marqueurs de résistance à la CQ atteignant 65 % ([Djaman et al., 2010](#)).

L'Amodiaquine (AQ) et la Sulfadoxine-pyriméthamine (SP) ont été choisies respectivement comme molécules de première et deuxième intention en remplacement de la CQ en 2003 ([Henry et al., 2002](#)). En 2005, elles ont été remplacées à leur tour par des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine (CTA) dont l'Artesunate-Amodiaquine ou ASAQ et l'Artemether-Lumefantrine (AL) préconisées respectivement en première et en seconde intention dans la prise en charge du paludisme simple ([Anonyme-2, 2008](#)).

Aujourd'hui, la SP est exclusivement préconisée pour le traitement préventif intermittent (TPI) de la femme enceinte ([Anonyme-2, 2008](#) ; [WHO 2010](#)), malgré une baisse de sa sensibilité signalée depuis 2001 ([Djaman et al., 2002](#)). Cependant, cette association thérapeutique est restée accessible et bon marché faisant ainsi courir le risque de l'inefficacité à long terme du TPI à la SP dans le pays ([Granado et al., 2009](#) ; [Frosh et al., 2011](#)). La recherche de molécules de remplacement pour le TPI pourrait dès lors s'imposer. D'où l'urgence de consentir des efforts pour protéger et maintenir l'efficacité actuelle du TPI à la SP.

L'écart entre la prise des décisions et leur application effective a favorisé une utilisation prolongée et abusive de la SP et de la CQ dans le pays ([Granado et al., 2011](#)). Le retrait de la CQ a été rendu effectif par l'arrêté ministériel n°024/CAB/MSHP du 12 Janvier 2007. L'accès à la SP et à la CQ a été amplifié par le contexte de trouble sociopolitique qu'a connu le pays entre 2002 et 2008 ([Betsi et al., 2006](#) ; [Fürst et al., 2009](#)). Les conséquences d'une accessibilité prolongée à ces deux molécules antipaludiques usuelles sur les parasites de *P. falciparum* devraient être déterminées.

La désorganisation du système de santé dans un contexte de trouble sociopolitique a favorisé la marchandisation incontrôlée des soins et la multiplication des pratiques informelles. Une des conséquences en a été l'augmentation de la pression due aux médicaments antipaludiques les plus accessibles alors, comme la CQ ([Granado et al., 2009](#)). La pression médicamenteuse à cette molécule pourrait avoir augmenté entre 2002 et 2008. Cependant, très peu d'études portant sur la dynamique des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques usuels ont été réalisées en Côte d'Ivoire.

La mobilité des personnes joue aussi un rôle important dans la dissémination des parasites résistants ([Tatem et Smith, 2010](#) ; [Pindolia et al., 2012](#)). La Côte d'Ivoire, longtemps considérée comme une puissance économique en Afrique de l'Ouest, a attiré des personnes, générant ainsi des mouvements migratoires à partir de pays limitrophes ([Charmot et al., 1991](#)). À l'intérieur du

pays, des déplacements internes de populations se sont intensifiés ces dernières années. L'épidémiologie moléculaire locale de *P. falciparum* en a été certainement affectée. L'impact de la mobilité humaine sur la distribution des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ en Côte d'Ivoire mérite d'être élucidé.

Il importe de surveiller les résistances aux antipaludiques afin de garantir l'efficacité des traitements. L'impossibilité de réaliser les tests d'efficacité *in vivo* pour des raisons éthiques, le coût élevé et l'exécution délicate des tests de chimiosensibilité *in vitro* font des tests moléculaires des outils précieux pour étudier la résistance grâce à des marqueurs moléculaires de résistance validés comme ceux de la SP et CQ (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009). Au niveau des gènes de la dihydrofolate réductase (PfDHFR), la dihydroptéroate synthétase (PfDHPS) et la *chloroquine resistance transporter* (PfCRT), si les points de mutations conduisant à la résistance à la SP et à la CQ ont pour la plupart été identifiés, l'impact de la complexité des pressions évolutives comme la pression médicamenteuse, la mobilité des personnes, l'effet du faciès épidémiologique sur l'évolution des résistances à ces deux molécules n'a pas encore été élucidé en Côte d'Ivoire. Dans le cadre de ces travaux, les questions de recherche suivantes ont été abordées :

- Quelle est l'étendue du polymorphisme des marqueurs moléculaires associés à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et à la CQ dans des faciès épidémiologiques et populations différents ?
- Quelle est la répartition géographique des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et à la CQ dans des faciès épidémiologiques différents ?
- Quelle est la dynamique des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et à la CQ avant et après le retrait de ces molécules de la prise en charge du paludisme ?
- Quelle est la complexité des infections à *Plasmodium falciparum* dans des faciès épidémiologiques différents ?

En rapport avec ces questions de recherche, les hypothèses suivantes ont été vérifiées.

1. Les fréquences alléliques des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ sont encore élevées dans la population malgré le retrait de ces deux molécules.
2. Les prévalences des marqueurs moléculaires associés à la résistance à la SP et à la CQ sont plus élevées à Anonkoua-kouté et Ayamé
3. Les prévalences des marqueurs moléculaires associés à la résistance à la SP et à la CQ ont augmenté significativement à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.

4. La distribution des marqueurs microsatellites des populations de *Plasmodium falciparum* sont plus importante au Sud où l'endémicité du paludisme est plus forte qu'au Nord, en zone de faible endémicité palustre.

L'objectif général de cette étude a été de déterminer la dynamique de la résistance à la SP et à la CQ de 2002 à 2008 et la diversité génétique des populations de *Plasmodium* en Côte d'Ivoire afin d'obtenir des connaissances sur l'épidémiologie moléculaire de la résistance à ces deux molécules antipaludiques. Il s'est agi plus spécifiquement de :

1. déterminer le polymorphisme génétique des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ de *Plasmodium falciparum* à Anonkoua-kouté, Bonoua, Samo,
2. décrire la répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ entre Anonkoua-kouté et Ayamé au Sud et Dabakala au Nord,
3. analyser l'évolution des résistances de 2002 à 2008 à Anonkoua-kouté,
4. déterminer la complexité des infections à *Plasmodium falciparum* à Ayamé et à Dabakala.

La présente étude a pour but de déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires conférant la résistance de *P. falciparum* à la SP et à la CQ et leur évolution à moyen terme. Ces travaux sont le début de la mise en place de la carte nationale des prévalences des génotypes et des mutations associées à la résistance à la SP et à la CQ et dont les données pourraient être intégrées à des ressources plus larges de cartographie mondiale de résistance aux antipaludiques. Enfin, il représente un outil stratégique de référence pour les instances de prise de décisions comme le ministère de l'Hygiène publique et de la Santé, le PNLN, etc., ou pour des réseaux internationaux de recherches sur les résistances aux antipaludiques comme le WWARN (www.wwarn.org). L'étude a été structurée en quatre parties. La première partie aborde les généralités sur le paludisme, la seconde indique les matériels et méthodes utilisés au cours de l'investigation et la troisième partie présente les résultats obtenus qui ont été ensuite discutés dans la quatrième partie.

I. CONSIDERATIONS GENERALES

1.1 - Paludisme en Côte d'Ivoire

Le climat général en Côte d'Ivoire est chaud et humide. Il est de type équatorial dans le Sud côtier, tropical au Centre et semi-aride au Nord. L'année est répartie en trois saisons : une modérément chaude et sèche de novembre à mars, une autre très chaude et sèche de mars à mai et une autre chaude et humide de juin à octobre (Raso *et al.*, 2012). Les températures moyennes oscillent entre 25 et 32°C avec des extrêmes de 10 à 40°C. Il y a une importante variation climatique du Nord au Sud, d'où l'existence de zones écologiques ou faciès épidémiologiques différentes (Mouchet *et al.*, 2004 ; Raso *et al.*, 2012).

Le Sud-est de la Côte d'Ivoire est marqué par la présence de lagunes costales qui s'étendent sur 300 km le long de la moitié Est des côtes ivoiriennes en partant de la frontière ghanéenne. Le Sud et plus spécifiquement le Sud-ouest, est recouvert d'une forêt dense tropicale et pluvieuse. La ceinture guinéenne représentant une mosaïque forêt-savane traverse le pays d'Est en Ouest. Le Nord fait partie de la savane Ouest soudanaise (Raso *et al.*, 2012).

La transmission y est assurée par des vecteurs anophéliens appartenant à trois complexes. Le complexe *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera : Culicidae) constitué des vecteurs *An. gambiae s. s.*, principal vecteur de transmission, *Anopheles melas* Théobald, 1903 et *Anopheles arabiensis* Patton, 1905. Les deux autres complexes sont *Anopheles funestus* Giles, 1900 et *Anopheles nili* Théobald, 1904 (Adja *et al.*, 2011).

1.2 - Espèces plasmodiales infectant l'Homme

Le paludisme est causé par des espèces du genre *Plasmodium*. Il existe environ 120 espèces plasmodiales capables d'infecter les oiseaux, les reptiles et les mammifères. Seulement 5 d'entre elles infectent l'Homme en provoquant le paludisme. Ce sont par ordre chronologique de découverte :

- *P. falciparum* Welch (1897) est l'espèce la plus pathogène et la plus létale. Elle est la plus cosmopolite car retrouvée dans les régions équatoriales et subtropicales. Cette espèce est à l'origine des taux les plus élevés de complications et de mortalité du paludisme. *P. falciparum* est responsable de 80 % des infections et de 90 % des cas de décès imputables au paludisme. Les infections à *P. falciparum* peuvent entraîner la mort en quelques heures ou jours, surtout chez les enfants de moins de 5 ans s'ils ne sont pas rapidement pris en charge (Trampuz *et al.*, 2003).
- *P. malariae* Grassi et Feletti (1889) est fréquent en Afrique tropicale. Elle est présente dans quelques foyers en Afrique du Nord mais aussi autour de la Mer des Caraïbes et dans le Golfe

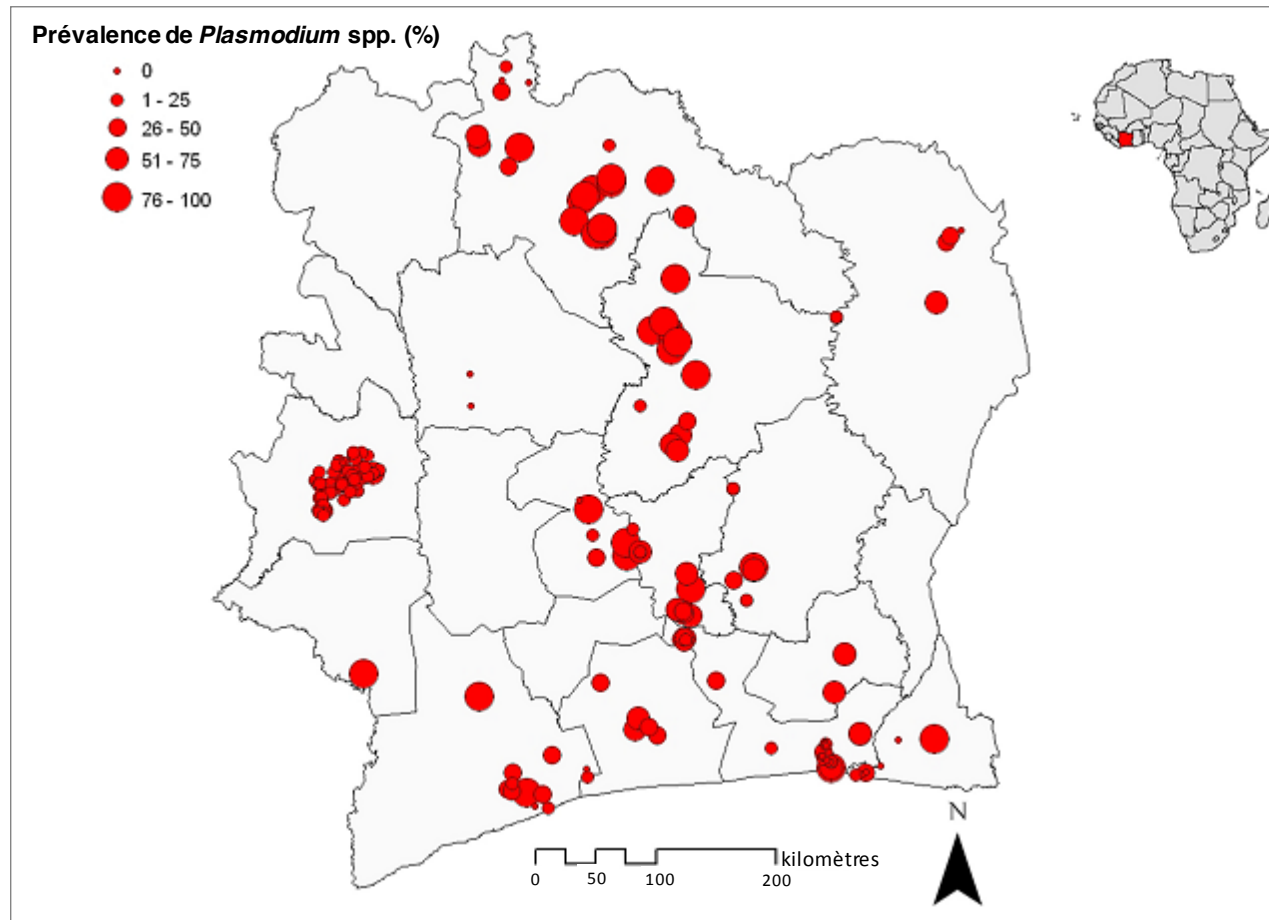


Figure 1. Prévalence de *P. falciparum* en Côte d'Ivoire.

Note : Ces valeurs ont été obtenues à partir d'enquêtes menées entre 1988 et 2007 chez des individus de moins de 16 ans. La prévalence moyenne générale est de 54,10 %. En subdivisant le pays en trois strates égales allant du Sud au Nord, la prévalence moyenne de *P. falciparum* est estimée à 37,30 %, 61,50 % et 61 %, respectivement, adapté de Raso *et al.* (2012).

du Mexique en Amérique centrale et du Sud, en Iran en Asie. Cette espèce provoque des accès palustres bénins. Elle a une longue incubation d'environ 14 jours dont peuvent résulter des infections chroniques pouvant durer jusqu'à 20 ans après l'infection originelle (Mueller *et al.*, 2007). Deux cas de paludisme sévère lui ont été attribués dont l'un chez un soldat français de retour de Côte d'Ivoire (Descheemaeker *et al.*, 2009 ; Bellanger *et al.*, 2010).

- *P. vivax* Grassi et Feletti (1890) est le moins exigeant en température. L'espèce est largement répandue en Amérique du Sud et en Asie. Longtemps considérée comme l'espèce des leucodermes à cause du dogme de l'antigène Duffy, *P. vivax* a été retrouvée récemment en zone tropicale et subtropicale chez des mélanodermes (Mendes *et al.*, 2011 ; Wurtz *et al.*, 2011). Elle peut causer des accès de reviviscence pendant 3 à 5 ans (Pukrittayakamee *et al.*, 2004). Les infections entraînent rarement la mort, mais des cas sévères de paludisme lui ont été attribués (Genton *et al.*, 2008 ; Rifakis *et al.*, 2008).
- *P. ovale* Stephens (1922) est la plus rare et la moins virulente. Elle est présente en Afrique intertropicale du Centre et de l'Ouest. Dans certaines régions du Pacifique, elle est principalement présente dans les zones endémiques où *P. vivax* est absent. L'infection à *P. ovale* est généralement bénigne mais peut récidiver après des mois. Trois cas de paludisme grave à *P. ovale* ont été néanmoins rapportés (Lee et Maguire, 1999 ; Rojo-Marcos *et al.*, 2008 ; Rozé *et al.*, 2011).
- *P. knowlesi* Stinton et Mulligan (1932) est génétiquement proche de *P. vivax* et infecte naturellement les macaques (Singh *et al.*, 2004). Il a été rapporté qu'elle infecte l'Homme. Les infections à *P. knowlesi* ont jusqu'à récemment été attribuées par erreur à *P. malariae* à cause de leur ressemblance morphologique. L'espèce est présente en Asie du Sud-est et est responsable d'infections palustres simples (Lee *et al.*, 2009). Un cas de paludisme sévère lui a cependant été attribué (Cox-Singh et Singh, 2008).

1.3 - Taxinomie des espèces plasmodiales infectant l'Homme

Plasmodium prend place dans le règne des protistes et appartient au phylum des organismes parasites obligatoires ou *Apicomplexa*, anciennement appelés *Sporozoa*, c'est-à-dire «capables de donner d'autres cellules» et à l'ordre des *Haemosporida* (Adl *et al.*, 2005). Le terme «protiste» désigne ici les eucaryotes au niveau d'organisation unicellulaire.

Les *Apicomplexa* Levine, 1980 (Adl *et al.*, 2005) constituent l'un des embranchements du rang des *Alveolata* Cavalier-Smith (1991) se caractérisant par l'existence d'une phase de sporogonie dans le cycle de vie du parasite ainsi que par la présence d'un complexe apical. La sporogonie est un mode de reproduction asexuée de sporozoïtes à partir d'un zygote diploïde par divisions successives. Le complexe apical regroupe un ensemble d'organites spécialisés indispensables au mécanisme d'invasion des érythrocytes dont les rhoptries, les granules denses et les micronèmes

(Adl *et al.*,2005).

L'agent du paludisme appartient à la classe des *Haemospororida* Danilewsky (1885) caractérisée par l'existence d'un zygote mobile ou ookinète, de microgamètes flagellés produits par schizogonie et d'oocyste dans lequel se développent des sporozoïtes. Le genre *Plasmodium* partage cette classe avec les genres *Babesia*, agent de la babésiose ou piroplasmose, *Cryptosporidium* agent de la cryptosporidiose, transmissible à l'Homme, *Eimeria* agent de la coccidiose des ovins et des oiseaux, *Neospora* agent de la Néosporose, *Theileria* agent de la Theileriose et *Toxoplasma* agent de la Toxoplasmose (Adl *et al.*, 2005).

1.4 - Cycle biologique de développement de *Plasmodium*

P. falciparum a un cycle hétéroxène à deux hôtes qui implique à la fois un vertébré c'est-à-dire l'Homme et un invertébré qui est un moustique hématophage femelle du genre *Anopheles*. Le développement biologique du parasite est sexué chez le moustique et asexué chez l'Homme. Le cycle parasitaire se décompose en une phase exoérythrocytaire et une phase endoérythrocytaire ; c'est un cycle haplodiploïde (**Figure 3**).

1.4.1 - Cycle chez l'Homme, l'hôte vertébré

1.4.1.1 - Phase exoérythrocytaire

La phase exoérythrocytaire débute avec le repas sanguin. Le moustique infecté inocule de la salive contenant des sporozoïtes vermiformes aux tissus sous-cutanés de l'hôte humain. Une fois inoculés, ils développent par des mouvements de glissement une dynamique robuste qui leur permet d'atteindre les capillaires dermiques. Ils traversent alors les couches vasculaires endothéliales pour se retrouver dans la circulation sanguine (Mota *et al.*, 2001 ; Frevert, 2004). Le changement de température, d'environ 30 °C dans la glande salivaire du moustique, à 37 °C au contact avec les cellules humaines, contribue à préserver l'infectivité et l'activation des sporozoïtes quiescents issus de la glande salivaire du vecteur. Les sporozoïtes activés entament les phases du cycle dans un état dit de compétence d'infectivité (Siau *et al.*, 2008).

Pénétration du parenchyme du foie

Les sporozoïtes du sang périphérique atteignent la barrière de cellules sinusoidales du foie où siègent les cellules de Kupffer ou CK. Ces derniers sont des macrophages ayant un rôle d'exposition d'antigènes. Ils sont immobilisés au niveau de la couche de cellules sinusoidales du parenchyme hépatique. C'est un positionnement stratégique qui permet d'éliminer du sang les corps étrangers ou autodétruits. Les CK possèdent à leur surface des protéoglycanes qui servent de points d'ancrage aux motifs héparinés de la protéine de surface du sporozoïte, ou CSP. Les sporozoïtes se déplacent par glissement le long du parenchyme. Ils se fixent aux protéoglycanes

des CK au niveau du sinus du foie où ils sont stoppés par interaction multivalente avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire de l'espace de Disse (Pradel *et al.*, 2004).

Les sporozoïtes passent à travers les CK par invagination et atteignent les couches des hépatocytes via les fenestrations sur lesquelles sont immobilisés les macrophages. Avant d'atteindre l'hépatocyte final, le sporozoïte transmigre par plusieurs cellules hépatiques grâce aux blessures occasionnées par l'activité membranaire lytique des phospholipases à la surface du sporozoïte. Une fois à destination, le sporozoïte pénètre dans l'hépatocyte final par invagination. La vacuole parasitophore se forme au moment de son entrée dans la cellule hôte. Son rôle est de protéger le parasite du cytosol de l'érythrocyte de l'hôte. La CSP est ensuite digérée par protéolyse (Frevert *et al.*, 2008).

Sortie des hépatocytes

Les schizontes du foie se multiplient par des séries de 16 mitoses successives chaque 8 heures ou plus jusqu'à atteindre environ 35 000 mérozoïtes par hépatocyte infecté. Après 6 à 10 jours (cas de *P. falciparum*) d'infestation, les hépatocytes rompent et larguent leur contenu dans le sang périphérique (Robert et Boudin, 2003). Les mérozoïtes hépatiques atteignent alors la lumière de la couche sinusoïdale via la barrière sinusoïdale qu'ils traversent sous forme de paquets de parasites de taille et de forme variables. L'enveloppe de ces paquets appelée « mérosome » ou « extrusome » est celle d'un hépatocyte nécrosé grâce à laquelle le parasite mime une cellule vivante afin d'être reconnue comme cellule du soi pour échapper aux CK (Sturm *et al.*, 2006). La libération de mérozoïtes hépatocytaires est un processus continu et asynchrone dans le paludisme à *P. falciparum* (Murphy *et al.*, 1990).

1.4.1.2- Phase endoérythrocytaire

Une fois la membrane des extrusomes rompue, quelques-uns des mérozoïtes libérés dans la circulation générale se fixent à la membrane de l'érythrocyte grâce à leur complexe apical. Les mérozoïtes issus des schizontes hépatiques pénètrent ainsi les érythrocytes à l'intérieur desquels ils se multiplient à nouveau (**Figure 2**). C'est l'invasion (Robert et Boudin, 2003).

La phase endoérythrocytaire est le cycle biologique du parasite associé aux signes cliniques du paludisme simple. Lorsque le globule rouge est infecté, *P. falciparum* l'altère pour sa survie. Il change la déformabilité de l'érythrocyte infecté de l'hôte (Dzikowski et Deitsch, 2009), induit de nouveaux canaux pour importer et exporter ses nutriments de l'érythrocyte. Il met en place des protéines adhésives à la surface du globule rouge infecté. Ces protéines adhésives forment des protubérances ou *knobs* à la surface du globule rouge qui favorisent la séquestration par cytoadhérence, rosetting, ou autoagglutination (Staines *et al.*, 2007 ; Maier *et al.*, 2009 ; Goldberg

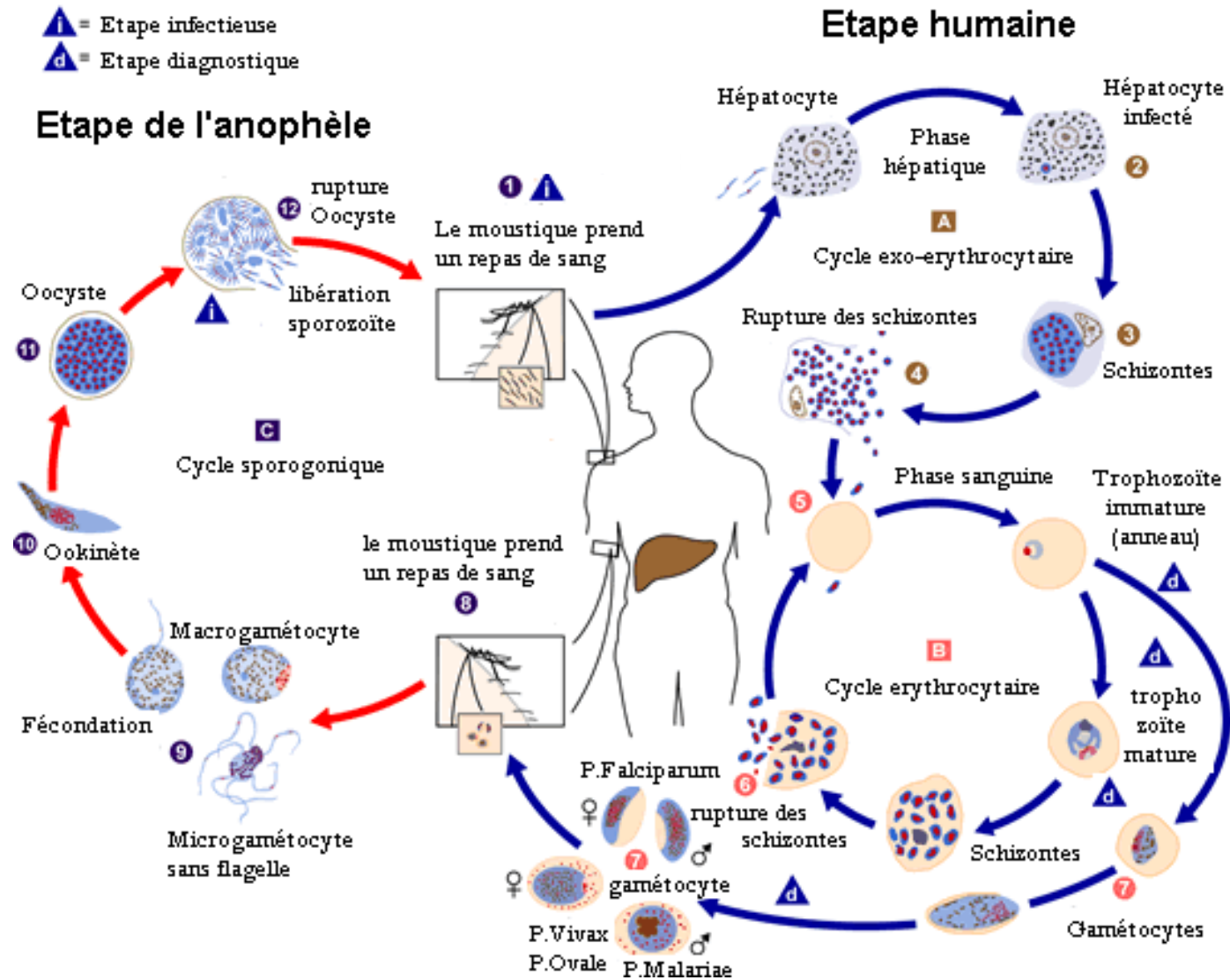


Figure 2. Cycle de vie de *Plasmodium spp.*

Adapté de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

et Cowman, 2010). Les protéines constitutives des protubérances sont impliquées dans le développement de l'immunité antipalustre et sont des cibles vaccinales (Soulama *et al.*, 2011). L'adhésion à l'endothélium des veinules capillaires au cours de la séquestration entrave la circulation sanguine vers des organes comme la rate dans laquelle les érythrocytes infectés sont détruits, le rein, le cerveau, ou le placenta. Après 48 ou 72 heures s'il s'agit de *P. malariae*, 8 à 32 mérozoïtes-fils sont libérés. Ils pénètrent chacun dans de nouveaux érythrocytes pour perpétuer le cycle endoérythrocytaire (Robert et Boudin, 2003). Un faible pourcentage de mérozoïtes se différencie en formes sexuées ou pré-gamètes appelés gamétocytes mâles ou femelles. Ces gamétocytes représentent un lien entre la phase haploïde au niveau de l'érythrocyte et la phase diploïde chez le vecteur. Les mécanismes moléculaires qui suscitent la gamétocytogenèse sont peu connus (Baker, 2010).

1.4.2- Cycle chez le moustique

La gamétogénèse a lieu chez le vecteur après l'ingestion puis l'activation des gamétocytes mâles et femelles. L'activation est induite par la chute de température entre le sang humain et le contenu stomacal du moustique, et par la présence de l'acide xanthurénique produit par l'estomac du moustique (Billker *et al.*, 1998). L'activation du gamétocyte mâle se produit au cours de l'exflagellation pendant lequel il se transforme en un corps globulaire haploïde appelé microgamète d'où se détachent 8 flagelles. L'activation du gamétocyte femelle aboutit à la formation d'un macrogamète haploïde (Sinden, 1998). La fécondation se produit environ une heure après le repas sanguin. Les deux noyaux haploïdes mâle et femelle à $n = 14$ chromosomes chacun (Gardner *et al.*, 2002), fusionnent pour former un zygote diploïde (**Figure 3**).

La fécondation est dite croisée lorsque ces génomes sont différents, ou autofécondation s'ils sont identiques, c'est-à-dire provenant d'un même clone. Cette brève phase diploïde dans un cycle biologique haploïde favorise la recombinaison du matériel génétique, y compris des gènes chromosomiques dont les mutations sont responsables de la plupart des résistances aux molécules antipaludiques (Randford-Cartwright *et al.*, 1991). Dans l'estomac du moustique, le zygote se développe en ookinète mobile qui se différencie en oocystes puis en sporocystes gorgés de sporozoïtes. Ceux-ci migrent vers les glandes salivaires du moustique (**Figure 3**). Les sporozoïtes formes invasives du parasite du paludisme, restent quiescents dans la glande salivaire de l'insecte, pour ne se différencier que chez l'hôte humain (Robert et Boudin, 2003).

1.5 - Complexité des infections à *Plasmodium falciparum*

Les infections mixtes à *P. falciparum* ou infections polyclonales résultent de fécondations croisées. Le terme d'infections polyclonales à *P. falciparum* ou multiplicité des infections à *P. falciparum* désigne le nombre moyen de génotypes du parasite portés par individu infecté. Il est

en générale égal à 1 dans les zones de faible transmission et supérieur à 1 dans les zones de forte transmission. Ce nombre sert à l'évaluation du niveau d'endémicité de la transmission du paludisme d'une zone donnée (Rogier *et al.*, 2009). C'est aussi un indicateur parasitologique du niveau d'immunité partielle acquise contre le paludisme (Mayengue *et al.*, 2009). La multiplicité des infections à *P. falciparum* dépend de facteurs comme l'âge de l'hôte (Ntoumi *et al.*, 1995), le polymorphisme génétique humain (Ntoumi *et al.*, 1997), le niveau d'endémicité et de transmission du paludisme (Arnot, 1998), le niveau d'urbanisation (Bogreau *et al.*, 2006 ;Soulama *et al.*, 2009 ; Assi *et al.*, 2010). La multiplicité des infections à *P. falciparum* peut varier entre individus ou au sein d'un même individu. C'est un des facteurs importants dont dépend la réponse thérapeutique au cours des essais cliniques (Aubouy *et al.*, 2003).

La variation intra-individuelle s'explique soit par la sensibilité de détection des génotypes de *P. falciparum* qui elle-même dépend de la densité parasitaire, soit par la grande diversité génétique du parasite dans la zone d'étude, soit par l'habileté des populations de clones à être séquestrées rapidement dans les capillaires des organes profonds (Jafari *et al.*, 2004). La variation entre individus du nombre de génotypes est due soit à l'exposition aux piqûres de moustiques et au nombre de sporozoïtes inoculées, soit à la différence de susceptibilité de l'hôte à l'infection, soit à la différence d'immunité partielle entre individus (Mayengue *et al.*, 2009).

1.6 -Antipaludiques

Le contrôle du paludisme exige une approche intégrée comprenant principalement la prévention, le contrôle vectoriel, l'utilisation d'antipaludiques efficaces en prophylaxie et la prise en charge effective des malades du paludisme (Wells *et al.*, 2009). Les antipaludiques usuels ont été victimes de leur efficacité, ce qui a suscité le développement d'antipaludiques de nouvelles générations.

1.6.1 - Antipaludiques classiques

Les antipaludiques usuels peuvent être classés en fonction de leur nature chimique, de leur point d'impact sur l'un des stades du cycle évolutif du parasite. Dans cette section, ils seront classés en fonction de leur origine-naturelle ou synthétique.

1.6.2 - Artémisinine et dérivés

Actuellement, l'artémisinine et ses dérivés sont considérés comme les antipaludiques les plus importants dans la prise en charge du paludisme (WHO, 2003). Connue des herboristes chinois depuis 168 avant Jésus-Christ, l'artémisinine ou « *qinghaosu* » est une molécule issue d'une substance naturelle, l'armoise *Artemisia annua* (*Asteraceae*) utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme fébrifuge et anti-hémorroïdaire. Jusqu'à 42 % du contenu total en artémisinine

est extrait des feuilles apicales de *A. annua* ou « *qing hao* », c'est-à-dire 'herbe verte' chez qui la substance s'accumule dans les trichomes granulaires (Bhakuni *et al.*, 1988 ; 1990). L'artémisinine a été caractérisée comme le constituant antipaludique de *A. annua* par des chercheurs chinois. La substance est retrouvée aussi en très faibles quantités chez *Artemisia apiacea* Hance et *Artemisia lancea* Vaniot (Hsu, 2006). Il s'agit d'une sesquiterpène lactone avec une liaison endopéroxyde unique essentielle pour l'action antipaludique (**Annexe 1a**).

L'artémisinine et ses dérivés (Artesunate, Artemether, β -Artemether, Arté-éter, Artélinat) sont largement utilisés contre les plasmodies résistantes. Ils pourraient interagir avec l'hème au cours d'un mécanisme à deux étapes (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). Dans un premier temps ils pourraient se fixer de façon covalente à l'hème pour donner un radical libre qui est un radical libre formé pourrait réagir avec des protéines spécifiques des membranes du système endomembranaire du parasite pour les détruire (Meshnick, 1994 ; van Agtmael *et al.*, 1999).

Ces composés agissent très rapidement sur les stades allant du trophozoïte au schizonte. Leur rapidité d'action et leur demi-vie très courte limitent le délai d'exposition à des doses subthérapeutiques. Ils réduisent la probabilité de survie de parasites résistants et font baisser les taux globaux de transmission du paludisme. Chez les individus pris en charge avec les CTA, la gamétocytémie diminue de 90 %. Ils réduisent la densité parasitaire plus rapidement que les autres antipaludiques (Hastings *et al.*, 2002 ; White et Pongtavornpinyo, 2003).

L'OMS recommande que les dérivés de l'artémisinine soient utilisés sous forme de CTA, c'est-à-dire en associations avec d'autres molécules dans la thérapeutique du paludisme (WHO, 2003). Plusieurs combinaisons existent dont l'Artesunate-Amodiaquine ou ASAQ et l'Artemether-Lumefantrine ou AL, recommandées par le PNLP dans la prise en charge des accès palustres simples en Côte d'Ivoire (Anonyme-2, 2008). Ces composés sont aussi utilisés dans la prise en charge des infections à *Schistosoma* spp., *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, au cytomégalovirus humain, au virus de l'*Herpes simplex*, dans les cas d'hépatites B et C (Efferth *et al.*, 2008). *In vitro*, elles ont même montré une activité contre certaines tumeurs (Efferth, 2007).

1.6.3 - Amino-2-alcools

Les amino-2-alcools se composent d'antipaludiques naturels comme la Quinine ou QN, d'antipaludiques synthétiques comme l'Halofantrine, la Lumefantrine et la Méfloquine. La QN est le premier antipaludique naturel utilisé en thérapeutique sous la forme de sels basiques de formiate de QN ou Quinoforme[®], d'Acétarsolate de QN ou Arsiquinoforme[®], de Bichlorhydrate de QN ou Quinimax[®]. Elle est métabolisée dans le foie. Son excrétion est biliaire et urinaire. Ces molécules exercent une action rapide uniquement sur les schizontes sanguins (Wells *et al.*, 2009). Hautement active sur toutes les espèces plasmodiales, la QN est actuellement utilisée à titre

curatif au cours des accès palustres graves à *P. falciparum* et dans les cas d'allergie ou d'échecs thérapeutiques aux autres antipaludiques (Anonyme-2, 2008).

1.6.4 - Amino-4-quinoléines

Ce sont des lysosomotropes - cette dénomination vient du fait de l'analogie de pH observée dans la vacuole digestive des parasites et dans les lysosomes des cellules de mammifères. En effet, au cours de son développement intraérythrocytaire normal, *P. falciparum* ingère une importante quantité d'hémoglobine qui est ensuite dégradée dans l'organelle. L'hème toxique qui résulte de la protéolyse de l'hémoglobine se minéralise en hémozoïne, dans un processus catalysé par la protéine de détoxification de l'hème. Une fois dans la vacuole digestive, la CQ inhibe la détoxification de l'hème en hémozoïne selon un mécanisme moléculaire encore débattu (Jani *et al.*, 2008).

La CQ, d'abord appelée Resorchin[®], a été synthétisée en 1934 par l'entreprise allemande Bayer (Andersag *et al.*, 1934). À partir de 1944, ce principe actif est utilisé en prophylaxie et en traitement curatif des accès palustres non compliqués. Considérée comme la molécule antipaludique la plus utilisée du XX^e siècle, la CQ pourtant bon marché, est abandonnée à cause des niveaux de résistance devenus inacceptables. La famille des Amino-4-quinoléines comprend également l'AQ qui garde encore une efficacité relative malgré sa découverte en 1948, d'où son utilisation actuelle en association avec les dérivés de l'artémisinine.

1.6.5 - Antifoliniques et antifoliques

Les antifoliniques et antifoliques font partie de la grande famille des antimétabolites. Ce sont deux classes de molécules qui ont pour cibles les enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques. Ces molécules agissent aussi sur tous les stades du développement parasitaire qui requièrent la synthèse d'acide nucléique. Après leur absorption, ces molécules ne s'accumulent pas directement dans le plasma mais se lient aux tissus, aux protéines et aux lipides de l'organisme, d'où leur effet prolongé. Leur bonne activité antipaludique est liée à la présence de groupements chlorophényl et isopropyl pour le Proguanil, à la présence du substituant 5-para-chlorophényl et du groupement 6-éthyl pour la pyriméthamine (**Annexe 1d**). Les antifoliques sont les sulfamides, c'est-à-dire des dérivés de l'amide-4-aminobenzène, l'acide sulfonique et les sulfones. Ils sont le plus souvent utilisés en association avec la pyriméthamine. C'est le cas avec la Sulfadoxine (**Annexe 1e**). Les antifoliniques ont pour cible la dihydrofolate réductase thymidylate synthase, (*pfldhfr-ts*) enzyme bifonctionnel chez *Plasmodium*, et les antifoliques, la dihydroptéroate synthase ou *pfldhps* (Ferone, 1977 ; Triglia *et al.*, 1998).

Les lysosomotropes et les antimétaboliques schizonticides agissent uniquement sur les formes intra-érythrocytaires asexuées du parasite. Le seul gamétocytocide encore utilisable à ce jour est la

Primaquine, une amino-8-quinoléine. Elle est majoritairement indiquée pour prévenir les rechutes à *P. vivax* ou *P. ovale* qui peuvent générer des accès palustres à distance de l'accès initial grâce aux hypnozoïtes. Ces derniers sont des stades parasitaires dormants au niveau hépatique (Cooper *et al.*, 1953).

1.7 - Quelques antipaludiques de nouvelle génération

Les efforts développés pour lutter efficacement contre le paludisme se heurtent au phénomène de résistance aux antipaludiques classiques. D'où l'urgence de développer des antipaludiques avec de nouvelles cibles. Cette section présente quelques molécules antipaludiques en développement ou en optimisation au cours de l'année 2009 (Wells *et al.*, 2009).

1.7.1 - Antipaludiques en développement

La piperaquine phosphate est une bisquinoléine qui, comme la CQ, inhibe la voie de la digestion de l'hème chez le parasite. Son activité antipaludique s'exerce sur *P. vivax* et *P. falciparum*, ainsi que sur *P. falciparum* CQR. Sa tolérabilité, son efficacité et sa pharmacocinétique en font une molécule prometteuse à action antipaludique rapide (Wells *et al.*, 2009).

Le maléate d'arterolane est un trioxolane synthétique, un peroxyde dont l'action antipaludique a été prouvée plus importante que celle de molécules comme la CQ, la Mefloquine et l'Artesunate. Elle est en cours de développement (Wells *et al.*, 2009).

La pyronaridine tétraphosphate est un dérivé d'acridine synthétisé en Chine en 1970 (Zoguerh *et Delmont*, 2000) et largement utilisée dans les cas de paludisme multirésistant à *P. falciparum* (Ramharter *et al.*, 2008). La pyronaridine en formulations par voies orale et injectable est actuellement commercialisée en Chine sous l'appellation commerciale de Malaridine et est administrée en association thérapeutique. Elle a récemment fait l'objet de tests d'efficacité thérapeutique de phase 2/3 sous sa forme combinée à l'Artesunate (Kayentao *et al.*, 2012 ; Rueangweerayut *et al.*, 2012).

L'azythromycine est un macrolide semi-synthétique dérivé de l'érythromycine et ayant une activité antiplasmodiale (Noedl *et al.*, 2006). Avec la QN, l'azythromycine a un effet synergique contre les souches de *P. falciparum* (Nakornchai *et Konthiang*, 2006). La molécule a une action lente et a été proposée en association thérapeutique avec des substances à action rapides comme les dérivés de l'artémisinine (Noedl *et al.*, 2006). La combinaison azythromycine-CQ est active contre les infections à *P. falciparum* et à *P. vivax*. L'intérêt pour l'azythromycine est dû à sa bonne tolérance, à sa sécurité et à son effet antibiotique dans les infections sexuellement transmissibles qui prévalent dans les régions d'endémie palustre (Chico *et al.*, 2008).

1.7.2 - Quelques molécules en optimisation

Plusieurs quinoléines méthanol de dernière génération ont été développées parmi lesquelles une identifiée sous le nom de code WR621308 a été considérée comme bon candidat à l'essai clinique. C'est un analogue à la Mefloquine, de longue demi-vie et de même efficacité, qui se singularise par une baisse importante de son effet sur le système nerveux central. La molécule pourrait être utilisée en TPI de la femme enceinte, de l'enfant, ou du voyageur (Dow *et al.*, 2011).

Une série d'inhibiteurs de l'enzyme de la dihydroorotate déshydrogénase de *P. falciparum* à base de triazolopyrimidine ont été mis en évidence. Parmi ceux-ci, le DSM265 a été identifié comme un inhibiteur potentiel de l'enzyme capable de détruire les parasites sensibles ou résistants (Coteron *et al.*, 2011).

L'enzyme serine hydroxyméthyltransferase de *P. falciparum* (PfSHMT) est sur la voie de synthèse des folates (**Figure 3**). Elle permet la synthèse du dTMP. Ses inhibiteurs pourraient être des antipaludiques potentiels. Des techniques de grande sensibilité pouvant les mettre en évidence sont en cours de développement (Sopitthummakhun *et al.*, 2012).

1.8 - Résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

La résistance à la plupart des antipaludiques est le principal écueil de la lutte contre le paludisme. Cette section définit la notion de résistance, présente les outils de la surveillance de l'émergence et de l'extension des résistances aux antipaludiques, en indique les intérêts.

1.8.1- Définition de la notion de résistance aux antipaludiques

Le terme «résistance du parasite» se définit comme l'aptitude du parasite à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinaires recommandées mais comprises dans les limites de la tolérance du sujet (WHO, 1973). Cependant, le médicament devrait accéder au parasite ou au globule rouge infecté pendant toute la durée nécessaire pour l'activité normale de la molécule (Bruce-Chwatt *et al.*, 1986).

1.8.2 - Historique de l'émergence et de la propagation des résistances

Cette partie revient sur les circonstances ayant conduit à la mise en évidence des résistances à quelques antipaludiques. Elle décrit aussi la propagation de la résistance et montre que celle-ci suit presque parallèlement le développement des antipaludiques. À l'exception de l'Artesunate, tous les mécanismes de résistance décrits à ce jour montrent que la résistance est un trait génétique acquis (Gregson et Plowe, 2005).

1.8.2.1 - Sulfadoxine-pyriméthamine

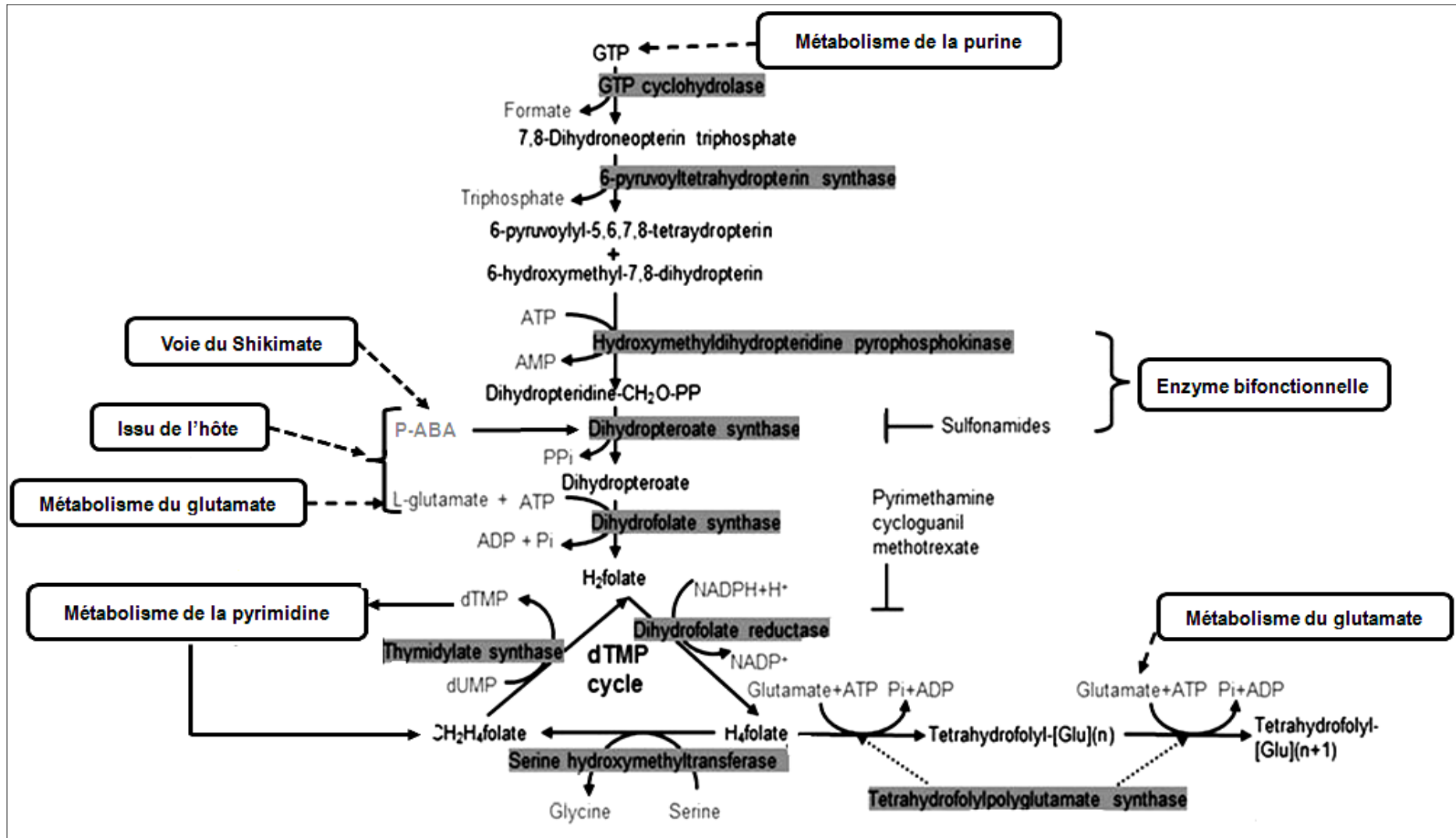


Figure 3. Biosynthèse des folates chez *Plasmodium* spp., adapté de Gregson et Plowe (2005)

1.8.2.1.1 - Emergence et bases génétiques des résistances à la pyriméthamine

La pyriméthamine a été administrée en monothérapie pour la première fois en 1950 en Tanzanie (Archibald, 1951). Malgré son succès, des résistances lui sont apparues assez rapidement après son introduction en tant qu'agent prophylactique (Jones, 1958). La transmission de la résistance à des individus symptomatiques émerge de façon locale dans la zone où le traitement curatif a été administré et dans son voisinage puis décroît avec la distance. La résistance à la pyriméthamine émerge d'un foyer en réponse à une pression médicamenteuse locale et suit une propagation rapide et contiguë (Clyde et Shute, 1957). Un tel développement rapide est caractéristique d'un mécanisme monogénique et additif sous-jacent évoluant de façon progressive (Plowe, 2009). La mise en évidence de points de mutation à l'origine de la résistance à la pyriméthamine en donne la confirmation (Gregson et Plowe, 2005). Les allèles du gène *pfdhfr* portant les deux mutations aux loci Ser-108-Asn et Asn-51-Ile, ou Ser-108-Asn et Cys-59-Arg, provoquent une longue clairance parasitaire. *In vitro* le parasite qui les porte est 300 fois plus résistant à la pyriméthamine que celui portant la mutation au locus Ser-108-Asn seule. Les infections portant le triple mutant *pfdhfr* avec les allèles Asn-108, Arg-59, Ile-51 présentent un taux élevé d'échec au traitement, les parasites de ces infections deviennent 2000 fois plus résistants. L'allèle quadruple mutant avec les allèles Leu-164, Asn-108, Arg-59, Ile-51 rend le parasite quasi intraitable et 20 000 fois plus résistant à la pyriméthamine (Plowe *et al.*, 1997 ; Nzila *et al.*, 2005).

1.8.2.1.2 - Propagation de la résistance à la pyriméthamine

Le balayage sélectif (Andolfatto, 2001 ; McCollum *et al.*, 2007, 2008; Zhou *et al.*, 2008) a permis de localiser les foyers d'émergence de la résistance à la pyriméthamine. Une première lignée portant les doubles mutations *pfdhfr* (CNRNI) a émergé à la frontière thaïlanno-cambodgienne dans les années 1960. Grâce à la mobilité des personnes, elle a migré en Mélanésie en tant que double mutant puis y a évolué en triple (CIRNI et CNRNL) puis quadruple (CIRNL) mutant avant de se propager aux autres régions d'Asie. Les triples mutants rencontrés en Afrique (CIRNI) sont de lignée Sud-est asiatique (Roper *et al.*, 2004 ; Maïga *et al.*, 2007). D'autres lignées ont été aussi mises en évidence en Afrique, une au Sénégal (Ndiaye *et al.*, 2006), une au Kenya, une autre au Cameroun (McCollum *et al.*, 2008), une dernière au Ghana (Mita *et al.*, 2009). Deux lignées indépendantes de double mutant *pfdhfr* de type CICNI ont aussi été déterminées en Amérique du Sud, l'une au Venezuela et l'autre au Pérou (McCollum *et al.*, 2007). Dorénavant, à cause de leurs origines multicentriques (McCollum *et al.*, 2006), il convient de distinguer toutes les lignées éventuelles de ce triple mutant et leurs contributions respectives à la résistance locale à la pyriméthamine.

1.8.2.1.3 - Bases moléculaires, émergence et propagation de la résistance à la Sulfadoxine

Les cinq codons 436, 437, 540, 581 et 613 sont impliqués dans la résistance à la Sulfadoxine. La mutation Gly-437 en est la mutation principale. L'enzyme PfDHPS portant cette mutation a une affinité réduite à la Sulfadoxine, entraînant une résistance de niveau largement corrélé au nombre de mutations du gène *pfdhps* (Triglia et Cowman, 1994).

Trois différents haplotypes triples mutant ont été mis en évidence (**SGNGA**, **SGEGA** et **AGEAA**) dans la région Thaïlando-Cambodgienne. Leurs prévalences sont restées élevées dans les régions Ouest et Sud du Cambodge plusieurs années après le retrait officiel de la SP en traitement curatif du paludisme. Ils n'ont pas été observés à l'Est du Cambodge. L'allèle PfDHPS **SGEGA**, de lignée différente de celle d'Asie, a été aussi observé en Amérique du Sud (Vinayak *et al.*, 2010). Les doubles mutants du gène *pfdhps* ont des origines multiples dont certaines sont africaines. Les génotypes **SGEAA** et **AGKAA** déterminés en Asie diffèrent de leurs homologues du Kenya (**SGEAA**) et du Cameroun (**AGKAA**) du point de vue de leurs évolutions (Vinayak *et al.*, 2010).

Dès le milieu des années 1990, les haplotypes portant l'allèle double mutant Gly-437 et Lys-540 ont été mis en évidence en Afrique de l'Est. Deux lignées **SGE** y ont été décrites. La lignée **SGE1** qui prédomine dans l'Est de l'Afrique sur une aire géographique incluant le Kenya, la Tanzanie, le Malawi et le Kwazulu-Natal en Afrique du Sud. La lignée **SGE2** a été détectée dans la même période dans le Nord-est du continent en Éthiopie et au Nord-est Soudan. Toutes ces lignées africaines maintiennent une aire géographique bien précise sans aucune possibilité de sympatrie (Anderson, 2009 ; Pearce *et al.*, 2009).

Vers 1995 en Afrique, les haplotypes portant la mutation Gly-437 se sont largement répandus sur une aire géographique allant de l'Afrique occidentale à l'Afrique centrale. Le simple mutant **SGKAA** et le double mutant **AGKAA** ont émergé à partir de plusieurs foyers indépendants, d'où ses origines multiples. Trois lignées prédominantes **AGK/SGK** de parasites résistant à la Sulfadoxine ont été décrites récemment. La lignée **AGK/SGK 1** a été décrite précisément au Sud-ouest de l'Afrique australe. La seconde lignée **AGK/SGK 2** a été mise en évidence en Afrique de l'Ouest. La dernière lignée **AGK/SGK 3** vient d'Afrique centrale, notamment du Cameroun (Anderson, 2009 ; Pearce *et al.*, 2009).

1.8.2.1.4 - Emergence de la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine

La résistance à la pyriméthamine et au Proguanil a été annoncée au Vietnam (Peters, 1970) dans la même période que des cas de résistance croisée à la pyriméthamine, à la CQ, à la Mepacrine, au

Proguanil et partiellement à la QN, observée pour la première fois avec des isolats provenant de Thaïlande et localités environnantes (Young *et al.*, 1963). L'efficacité de la Sulfadoxine et son action potentialisatrice de l'activité de la pyriméthamine ont été démontrées à travers plusieurs essais cliniques. Lorsqu'en Thaïlande la résistance croisée a été mise en évidence, l'association thérapeutique SP fut préconisée en traitement de seconde intention. Nonobstant, la combinaison s'est avérée une mauvaise solution pour un usage à long terme. La résistance à cette combinaison thérapeutique considérée très efficace fut alors prudemment évoquée. Elle apparaît enfin en Asie du Sud-est et en Amérique du Sud entre 1970 -1980 et en Afrique à la fin de la décennie 1990 - 2000 (Gregson et Plowe, 2005).

1.8.2.2 - Chloroquine

La première synthèse de la CQ (Resorchin) remonte à 1934. Mais c'est dans les années 1950 et 1960 que la CQ devient la pierre angulaire de la campagne d'éradication du paludisme adoptée lors de la 8^{ème} assemblée générale de l'OMS en 1955 (Packard, 1998). En 1957, le premier foyer d'infection à haut niveau de résistance à la CQ est détecté en Asie du Sud-est autour de la frontière thaïlano-cambodgienne. La résistance s'est ensuite rapidement propagée en Thaïlande où elle a été rapportée pour la première fois en 1962. Elle s'est ensuite étendue progressivement à la Malaisie, au Cambodge, au Vietnam, puis au Burma en 1969 (Gregson et Plowe, 2005). Dans la même période, en 1960, deux foyers de résistance à la CQ ont été identifiés en Amérique du Sud, l'un au Venezuela et l'autre en Colombie dans la vallée de la Magdalena. Un quatrième foyer d'émergence fut Port Moresby en Papouasie Nouvelle Guinée d'où deux cas d'infection à *P. falciparum* CQR ont été rapportés en 1976 (Grimmond *et al.*, 1976).

En Afrique, les infections à *P. falciparum* CQR apparaissent pour la première fois chez des voyageurs non immuns de retour du Kenya (Fogh *et al.*, 1988). La résistance à la CQ progresse de proche en proche, de l'Est vers l'Ouest de l'Afrique, atteignant l'extrémité Ouest du continent en 1988 (Charmot *et al.*, 1991). En Côte d'Ivoire, les trois premiers cas confirmés de CQR ont été rapportés en 1987 (Nicoulet *et al.*, 1987). Aucun foyer d'émergence n'a été détecté en Afrique. Ces foyers sont caractérisés par une transmission de type « épidémie permanente et localisée » et une structure de populations de *P. falciparum* de type métapopulation. Ces caractéristiques seraient inexistantes en Afrique (Ariey *et al.*, 2003). Le continent a été envahi par des allèles triple mutant **CVIET** flanqués du microsatellite (TAAT)₃(TA)₁₅ caractéristique des lignées Sud-est asiatiques. La lignée Sud américaine de ce triple mutant porte le microsatellite (TAAT)₃(TA)₁₄ (Ariey *et al.*, 2006). Les génotypes CQR se sont propagés de façon contigüe et progressive à partir quatre foyers. Deux théories expliquent cette propagation. La résistance est due soit à des effets épistatiques de mutations du gène *pfcr*t (Hasting, 2001), soit à l'acquisition, à la sélection et à la

fixation d'haplotype particulier sous la pression de la CQ puis à sa propagation en block par méiose (Wootton, *et al.*, 2002 ; Arieu *et al.*, 2003).

1.8.2.3 - Quinine

Les premières utilisations de la QN par les occidentaux remontent aux années 1630, au Pérou en Amérique du Sud. A cette époque, les autochtones péruviens utilisaient l'écorce de l'arbre du quinquina jaune comme antipyrétique. Cet effet antipyrétique fut aussi expérimenté par les jésuites qui l'utilisent comme remède pour soigner la Comtesse de Cinchon, épouse du vice-roi du Pérou. L'écorce du quinquina est ensuite envoyée en Espagne, en Occident, où l'on se rend bientôt compte que les fièvres intermittentes qu'elle traite sont caractéristiques du paludisme, faisant de la plante le premier antipaludique connu. La QN est l'alcaloïde qui en fut extrait en 1820. Sa structure chimique a été déterminée vers 1830 (Kaufman et Ruveda, 2005).

Dès lors, seul antipaludique en Occident, la QN est utilisée jusque pendant la première guerre mondiale. Les stocks s'épuisent en Allemagne devant la forte demande. Ce qui suscite le développement des 8-Aminoquinoléines, premiers antipaludiques synthétiques. Cependant, ceux-ci ne peuvent se substituer à la QN à cause de leur toxicité (Gregson et Plowe, 2005). Les premiers cas de résistance à la QN sont rapportés en 1908 au Brésil et confirmés en 1938 chez des expatriés allemands, travailleurs du rail, retournant de la frontière Bolivie - brésilienne.

Ici, la résistance se manifeste par une tolérance des parasites à des doses croissantes de QN (Clyde, 1972b) et se définit comme un échec de la molécule à éliminer les parasites après 7 jours de traitement (Okombo *et al.*, 2011). Cependant, plusieurs essais *in vivo* attestent que la QN est restée efficace dans la plupart des zones d'endémie palustre entre 1970 et le début des années 2000 (Myint *et al.*, 2004). Si dans le Sud de l'Asie des cas de résistance ont été rapportés récemment (de Vries *et al.*, 2000 ; McGready *et al.*, 2005), en Afrique, la résistance à la QN n'est pas encore établie (Baliraine *et al.*, 2011 ; Briolant *et al.*, 2011).

1.8.2.4 - Artesunate et ses dérivés

L'annonce de la résistance de *P. falciparum* à l'Artesunate a été faite après avoir observé une sensibilité *in vivo* significativement plus réduite des parasites provenant de l'Ouest du Cambodge, à Pailin, par rapport à ceux du Nord-Ouest de la Thaïlande ou ailleurs. Cette perte de sensibilité à l'Artesunate se caractérise par un retard de la clairance parasitaire chez des parasites très homogènes. Cette observation n'a pu être expliquée ni par la pharmacocinétique de la molécule, ni par les facteurs liés à l'hôte. Les populations de parasites ont été exposées à des doses subthérapeutiques d'Artesunate utilisé en monothérapie pendant plus de 30 ans et que des molécules contrefaites d'artémisinine ont circulé dans la région. Ceci a été la source probable des principales pressions ayant favorisées la sélection de ce phénotype (Dondorp *et al.*, 2010). La

clairance parasitaire, ou temps au cours duquel les parasites sont éliminés du sang, est un caractère dont 56-58 % de la variation a une composante génétique propre au parasite (Anderson *et al.*, 2010). Toutes les populations de parasites du Sud-est asiatique sont faiblement hétérogènes car elles pourraient être issues de lignées isogéniques c'est-à-dire identiques par clonalité (Anderson *et al.*, 2000). Elles ne diffèrent donc que par leur norme de réaction, c'est-à-dire l'environnement auquel elles ont été exposées dans leurs régions respectives, l'une dans l'Ouest du Cambodge, l'autre dans le Nord-est de la Thaïlande (Lynch et Walsh, 1998).

Le phénotype « longue clairance parasitaire » porté par les parasites de Pailin, à l'Ouest du Cambodge, pourrait être un caractère héritable (Anderson *et al.*, 2010) dont la recherche du déterminisme génétique fait l'objet de nombreux travaux en cours. Récemment, des travaux portant sur une lignée isogénique de *P. chabaudi*, le parasite des rongeurs, a révélé que la substitution au locus Val-2728-Phe du gène *ubp1* codant pour l'enzyme de de-ubiquitination confère à l'Artesunate une longue clairance parasitaire (Hunt *et al.*, 2010). Les mécanismes génétiques sous-jacents ne sont pas encore connus.

Cependant, les jeunes parasites portant ce phénotype ont une activité métabolique ralentie doublée d'une intense activité de protéosynthèse et de pli de protéines. Cette dernière activité a même été observée chez les parasites adultes normaux, chez qui ces fonctions existent mais de façon sous-régulée. Les dérivés de l'artémisinine pourraient désactiver les protéines plasmodiales via l'alkylation ou le stress oxydatif, plutôt que d'affecter une cible spécifique (Mok *et al.*, 2011).

1.8.3 - Facteurs favorisant l'émergence et l'extension de la résistance aux antipaludiques

La cause principale de l'émergence et l'extension de la résistance aux antipaludiques est la pression médicamenteuse considérée comme le moteur de l'évolution des parasites. Elle est favorisée par plusieurs facteurs.

1.8.3.1 - Intensité de la transmission palustre (Rôle des vecteurs anophéliens)

En zone de forte endémicité palustre, le niveau élevé de la transmission est maintenu en grande partie par l'immunité partielle qui protège de la prise d'antipaludiques dans les infections asymptomatiques. La survie des populations de parasites ne se trouve pas menacée puisque l'utilisation d'antipaludiques reste en-deçà du seuil de sélection des résistants (Koella et Antia, 2003). En revanche, la prévalence des piqûres infectantes conduit à la prise courante d'antipaludiques. Les nouvelles infections entrent alors au contact de doses subthérapeutiques d'antipaludiques capables de favoriser la sélection de parasites résistants dont les probabilités de survie des descendants reste néanmoins faibles (White *et al.*, 2009).

En zone de faible endémicité au contraire, l'absence d'immunité partielle exige la prise systématique d'antipaludiques en cas d'infection (Luxemburger *et al.*, 1996). La pression médicamenteuse qui s'exerce sur les populations de parasites y est plus forte. D'où une sélection de parasites résistants.

1.8.3.2 - Hyperparasitémie

Sans aucun traitement, les populations parasitaires peuvent soit se stabiliser soit décroître après plusieurs cycles endoérythrocytaires sous l'effet combiné de l'activation des défenses immunitaires non spécifiques, de l'augmentation de la fonction splénique de clairance, de l'inhibition du développement des schizontes par la fièvre, de la diminution de l'effectif des globules rouge fragiles (White *et al.*, 2009 ; Gbotosho *et al.*, 2011). Il peut advenir que le parasite échappe à ces mécanismes de contrôle pour évoluer vers une hyperparasitémie qui, si elle est mal prise en charge, devient un environnement favorable à la sélection *de novo* des parasites résistants. D'abord parce que les parasites sont présents en grand nombre, ensuite parce que les mécanismes ayant conduit à ce lourd fardeau ne sont pas réversibles pour éliminer les parasites résistants sélectionnés, enfin parce que les patients hyperparasités présentent un risque élevé de recrudescence (White *et al.*, 2009).

1.8.3.3 - Mauvaise utilisation des antipaludiques

L'utilisation d'antipaludiques à des doses sub-curatives élimine les parasites sensibles et sélectionne les mutants résistants préexistants. Une pharmacocinétique similaire s'observe avec les antipaludiques à demi-vie longue utilisés en monothérapie (Watkins et Mostowo, 1993). L'utilisation des antipaludiques à doses subthérapeutiques peut résulter soit d'un mauvais suivi des traitements dû souvent à un manque d'informations relatives à l'intérêt de respecter strictement le médicament prescrit par son médecin, soit simplement à une mauvaise prescription médicales (Soares *et al.*, 2009).

1.8.3.4 - Mobilité des populations humaines

Des Hommes et/ou des vecteurs peuvent introduire de nouvelles souches résistantes qui seront rapidement sélectionnées. Ces facteurs ont un effet plus ou moins direct sur les populations locales de parasites (Tatem et Smith, 2010 ; Pindolia *et al.*, 2012). Sur les 125 millions de personnes voyageant vers les pays endémiques, environ 10 000 infections ont été rapportées auprès des voyageurs de retour en 2010. Comme il s'agit d'une sous-estimation, ce chiffre devrait excéder en réalité 30 000 infections. En Europe, le nombre d'infections importées a décuplé de 1970 à 2000 (de 1 500 cas à 15 000 cas), avant de décroître à environ 6 000 cas en 2010 (<http://data.euro.who.int/cisid>). Dans les pays endémiques, les voyages des pays non endémiques vers les pays endémiques sont une source importante et peu connue de paludisme sévère.

1.9 -Méthodes d'étude de la sensibilité des antipaludiques

Il existe plusieurs méthodes de surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques. Celles-ci incluent les tests d'efficacité thérapeutique, les tests de chimiosensibilité ou tests *in vitro* et les tests moléculaires.

1.9.1 - Test d'efficacité thérapeutique

1.9.1.1 - Définition

Le test d'efficacité thérapeutique est un protocole d'étude destiné à déterminer l'efficacité d'un schéma thérapeutique donné dans le but d'établir s'il conserve son utilité ou s'il doit être remplacé pour le traitement de routine du paludisme à *P. falciparum* simple. Les tests d'efficacité thérapeutique permettent ainsi d'étudier la réponse thérapeutique dans un délai donné et codifié, en tenant compte des réponses cliniques et parasitologiques.

1.9.1.2 - Intérêt

Ils ont l'avantage de refléter la vraie nature biologique de la réponse à un traitement qui est une interaction complexe entre les parasites, les molécules, la réponse de l'hôte. L'essai clinique est réalisé sur le terrain et les résultats sont relativement simples à interpréter. Cette méthode fut traditionnellement considérée comme la méthode de référence de la détermination de la résistance aux médicaments (WHO, 1996). Actuellement, le test utilisé est le protocole OMS de 28 jours extensible à 42 jours évaluant l'efficacité thérapeutique *in vivo* en tenant compte à la fois des réponses parasitologiques et cliniques en zones de forte endémie (WHO, 2003).

1.9.1.3 - Limites

Cependant plusieurs facteurs liés à l'hôte peuvent influencer la réponse thérapeutique dont le niveau d'immunité partielle, la pression médicamenteuse, les conditions métaboliques et nutritionnelles de l'hôte, la présence et prévalence des épisodes d'accès fébrile, le fond génétique de l'hôte et la présence de parasites compétitifs, voire le niveau nutritionnel (Rovira-Graells *et al.*, 2012).

1.9.2 - Tests de chimiosensibilité

1.9.2.1 - Définition

Les tests de chimiosensibilité évaluent la réponse *in vitro* du parasite au principe actif de la molécule. L'efficacité d'un antipaludique, l'immunité du patient et les variations pharmacocinétiques interindividuelles observable *in vivo*.

1.9.2.2 - Principe

Les trophozoïtes jeunes sont mis au contact de concentrations croissantes de principe actif d'un polyclonal, la CI50 est le reflet de la sensibilité moyenne des différents parasites composant l'isolat

antipaludique. Il est alors possible de déterminer la concentration d'antipaludique inhibant de 50 % (CI50) la croissance parasitaire ou la maturation de trophozoïtes en schizontes. Lorsque l'isolat est Pour déterminer la sensibilité d'un isolat, on compare alors la concentration pour 50 % d'inhibition déterminée à une valeur seuil définie pour chaque molécule étudiée (Eboumbou-Moukoko *et al.*, 2009).

1.9.2.3 - Typologie

Différents types de tests se distinguent par le marqueur de croissance parasitaire utilisé. La méthode de référence est le test isotopique à l'hypoxanthine radiomarquée au tritium. La croissance parasitaire a lieu en présence de l'hypoxanthine tritiée, base mineure de type purique. Les bases puriques sont des précurseurs de la synthèse des acides nucléiques. L'intensité de la radioactivité émise par l'échantillon contenant le principe actif sera proportionnelle à la croissance parasitaire. En général le comptage s'effectue après 42 heures d'incubation. Cette méthode à l'inconvénient d'être très coûteuse en matériel et en retraitement des déchets radioactifs (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009).

Il y a aussi le test OMS III qui utilise le comptage microscopique des formes ayant atteint le stade schizonte après 24 heures de culture. Cette technique est très dépendante de l'opérateur et n'est validée que lorsqu'au moins 20 % de schizontes sont obtenus dans les puits témoins (sans antipaludique). D'autres tests existent comme les tests colorimétriques qui dosent par une technique immuno-enzymatique ELISA différents marqueurs de la croissance parasitaire comme la lactate déshydrogénase de *P. falciparum* (PfLDH) ou la protéine riche en histidine 2 (HRP2) (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009).

1.9.2.4 - Limites

Ces méthodes sont généralement réalisées dans des laboratoires de référence aux standards internationaux. Elles exigent des procédures de contrôle qualité et des biologistes expérimentés. Les tests de chimiosensibilité *in vitro* sont coûteux. Les laboratoires qui les utilisent sont localisés dans quelques régions sentinelles du monde. De plus, la détermination des seuils de résistance est délicate et nécessite, en parallèle, des tests *in vivo* pour corrélérer au maximum les valeurs de chimiosensibilité aux réponses thérapeutiques. Ces méthodes sont mal appropriées pour la surveillance de la résistance puisqu'elles exigent des logistiques difficiles en situation de terrain et ne peuvent être réalisés que sur un nombre réduit de molécules à la fois (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009).

1.9.3 - Tests moléculaires

Trois principales méthodes de surveillance existent dont les premiers sont les tests d'efficacité thérapeutique ou essais cliniques. Ce sont des protocoles d'étude destinés à déterminer l'efficacité

d'un schéma thérapeutique donné dans le but d'établir s'il conserve son utilité ou s'il doit être remplacé en tant que traitement de routine du paludisme simple à *P. falciparum*. Ils permettent d'étudier la réponse thérapeutique dans un délai donné et codifié, en tenant compte des réponses cliniques et parasitologiques (WHO, 1996). Ces tests ont l'avantage de refléter la vraie nature biologique de la réponse à un traitement qui est une interaction complexe entre les parasites, les molécules, la réponse de l'hôte (Rovira-Graells *et al.*, 2012). L'essai clinique est conduit sur le terrain et les résultats sont relativement simples à interpréter. Toutefois, comme la SP et la CQ ont été retirées, les essais thérapeutiques ne peuvent être mises en œuvre pour évaluer leur sensibilité actuelle pour des raisons éthiques.

Il y a aussi les tests de chimiosensibilité qui évaluent la réponse parasitaire au traitement par un contact direct entre le parasite et le principe actif *in vitro*. Des trophozoïtes jeunes sont mis au contact de concentrations croissantes d'un principe actif. Il devient alors possible de déterminer la CI50 de la croissance parasitaire. Procéder ainsi a l'avantage d'éliminer des cofacteurs majeurs de l'efficacité d'un antipaludique, l'immunité du patient et les variations pharmacocinétiques interindividuelles observables *in vivo* (Basco et Ringwald, 2000). Cependant, ces méthodes sont coûteuses et généralement réalisées dans des laboratoires de référence aux standards des pays industrialisés. De plus, la détermination des seuils de résistance est délicate et nécessite, en parallèle, des tests *in vivo* pour corrélérer au maximum les valeurs de chimiosensibilité aux réponses thérapeutiques (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009).

Enfin, il existe des tests moléculaires qui sont des méthodes d'identification de variants génétiques réalisées sur les acides nucléiques du parasite (Sibley et Ringwald, 2006). Il s'agit de rechercher les modifications des gènes du parasite impliqués dans sa résistance aux antipaludiques (Eboumbou-Moukoko, *et al.*, 2009). Ces tests nécessitent de disposer que de l'ADN parasitaire et non de parasites vivants. Cela permet de limiter les problèmes de biosécurité et les contraintes de chaîne du froid ou de logistique qu'implique l'étude *in vitro* des isolats. Le recueil, le transport et la conservation de l'ADN peuvent être effectués sur des supports buvards traités pour assurer la conservation de l'ADN et détruire les agents pathogènes. La conservation de l'ADN peut être assurée à température ambiante. Ces tests permettent des études transversales des résistances sans nécessiter un suivi longitudinal prolongé des participants (Eboumbou Moukoko, *et al.*, 2009). Cela peut être utile pour les évaluations des résistances dans les zones reculées ou d'accès difficile en périodes de conflits armés (Djimé *et al.*, 2004 ; Betsi *et al.*, 2006). Les tests moléculaires donnent des indications précises sur la prévalence des populations plasmodiales prédites comme résistantes, y compris lorsque les participants sont infectés à la fois par des parasites sensibles et des parasites résistants. Ils peuvent donc être à la base de systèmes d'alerte précoce de

l'émergence des résistances capables de détecter des variations temporelles ou spatiales de résistances indétectables par les autres méthodes de surveillance. Les tests moléculaires permettent en outre d'évaluer la sensibilité à plusieurs familles d'antipaludiques sur le même échantillon. Leurs résultats ne dépendent pas de facteurs liés à l'individu comme l'immunité acquise, contrairement à ceux des tests *in vivo* (Basco et Ringwald, 2000).

1.9.3.1 - Intérêt des marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont des outils précieux pour surveiller l'émergence et la dissémination de la résistance aux antipaludiques. Ils servent de recours pour les décideurs dans le choix des politiques de prise en charge du paludisme dans les zones où la résistance est encore faible ou a atteint un niveau modéré. Les tests moléculaires constituent un moyen précoce pour prévenir le développement des résistances par la mise en place de système de surveillance adéquat. Ils permettent entre autres, de cartographier des profils de résistance aux antipaludiques au niveau national ou régional (Eboumbou-Moukoko *et al.*, 2009).

1.9.3.2 - Intérêts des marqueurs moléculaires de la Sulfadoxine-pyriméthamine et de la Chloroquine

La résistance aux antipaludiques résulte de polymorphismes de séquence uniques ou SNP qui sont la source de variation la plus importante à l'échelon moléculaire (Gibson et Muse, 2004). Ils occupent une place importante dans les études biologiques, d'évolution moléculaire, de génétique des populations, d'épidémiologie moléculaire de la résistance aux antipaludiques, etc. A ce jour, les marqueurs moléculaires de la résistance à la SP et à la CQ sont sans controverse, les seuls qui soient les mieux corrélés aux échecs thérapeutiques dus à ces deux molécules (Gregson et Plowe, 2005).

1.9.3.2.1 - Utilisation courante de la Sulfadoxine-pyriméthamine et de la Chloroquine

La SP est encore préconisée en TPI de la femme enceinte dans certaines régions y compris en Afrique de l'Ouest (Zongo *et al.*, 2007). La surveillance moléculaire pourrait mettre ainsi en évidence une prévalence croissante des marqueurs de résistance, preuves suffisantes pour convaincre les décideurs de l'arrêt de l'utilisation abusive de molécules dont l'efficacité est en déclin (Plowe *et al.*, 2007; Frosh *et al.*, 2011).

L'OMS a adopté l'utilisation de la SP en prophylaxie chez l'enfant même dans les zones où son efficacité dans la prise en charge du paludisme simple semble compromise. La surveillance épidémiologique pourrait permettre d'établir l'efficacité du TPI à partir de marqueurs moléculaires, en fonction du niveau de transmission ou du niveau d'immunité partielle (Plowe *et al.*, 2007 ; Greenwood, 2010).

1.9.3.2.2 - Cas du Triméthoprime-Sulfaméthoxazole

Le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TS) est une association thérapeutique proche de la SP utilisée dans la prise en charge des fièvres liées à des affections respiratoires chez l'enfant. Cette association thérapeutique est aussi utilisée en prophylaxie contre les infections opportunistes survenant chez les individus infectés par le VIH. Les deux combinaisons pourraient avoir les mêmes cibles enzymatiques PfdHFR et PfdHPS. Cependant, cela ne fait pas encore l'unanimité au sein des paludologues (Hamel *et al.*, 2005; Thera *et al.*, 2005 ; Plowe *et al.*, 2007).

1.9.3.2.3 - Retour éventuel de la sensibilité aux molécules retirées

Grâce aux marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ, d'anciennes molécules peuvent être réintroduite dans les politiques de prise en charge du paludisme simple et à mieux gérer leur efficacité. On considère qu'après une certaine période de non utilisation d'une molécule donnée, les parasites peuvent redevenir sensibles à cette molécule. Dans certains contextes, au Malawi et au Brésil, des retours de sensibilité à la SP et à la CQ ont été rapportés environ 10 années après leur retrait (Kublin *et al.*, 2003 ; Gama *et al.*, 2009).

1.9.3.3 - Marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques classiques

1.9.3.3.1 - Marqueurs de résistance à la pyriméthamine

Des mutations impliquées dans la résistance aux antifolates ont été déterminées (Peterson *et al.*, 1988) sur les gènes *pfdhfr* (Brik *et al.*, 1987) et *pfdhps* (Brooks *et al.*, 1994; Triglia et Cowman, 1994) codant pour des enzymes impliquées dans la voie métabolique des folates de *P. falciparum*. L'interruption de la synthèse des folates par des inhibiteurs des deux gènes fait décroître totalement les quantités de tétrahydrofolate, un cofacteur nécessaire lors des réactions de transfert des molécules monocarbonées aux voies de biosynthèse des purines, pyrimidines et acides aminés (Ferone, 1977). Les faibles niveaux de tétrahydrofolate entraînent la chute de la conversion de la glycine en serine, réduisent la synthèse de la méthionine et diminuent les niveaux de thymidylate avec l'arrêt subséquent de la réplication de l'ADN (Gritzmacher et Reese, 1984 ; Triglia et Cowman, 1999) (Figure 4).

Ces mutations mettent en évidence le rôle déterminant de ces enzymes dans la résistance aux antifolates. Une serine a été détectée en position 108 de la protéine PfdHFR chez le clone sensible 3D7, alors qu'une substitution en Asp a été mise en évidence chez l'isolat résistant à la même position. D'autres mutations ont été observées : Asn-51-Ile, Cys-59-Arg et Ile-164-Leu. La mutation Ser-108-Asn est essentielle pour la PfdHFR. Ces mutations additionnelles augmentent la CI50 de la pyriméthamine.

Une mutation inconnue au codon Cys-50-Arg et une séquence répétée de 15 paires de base insérée entre les codons 30 et 31, dénommée « répétition de Bolivie » ont été décrites chez des isolats d'Amérique latine (Plowe *et al.*, 1997). La mutation pourrait jouer un rôle similaire à celui de la mutation C59R des isolats africains (Cortese et Plowe, 1998). Elles sont mutuellement exclusives (Plowe *et al.*, 1997; Cortese *et al.*, 2002). Quant à la « répétition de Bolivie » aucun rôle important ne lui a été découvert dans la résistance à la pyriméthamine. Elle semble plutôt compenser la perte de fonction de l'enzyme PfDHFR en présence de la mutation Leu-164 dans les isolats Sud-américains (Cortese et Plowe, 1998). L'haplotype PfDHFR **IRNL** a été mise en évidence suite à la prise en charge du paludisme simple à *P. falciparum* avec le TS (Jelinek *et al.*, 1999 ; Khalil *et al.*, 2003). La mutation Ser-108-Asn semble importante dans la résistance au Triméthoprime. Cependant, ce dernier pourrait être moins affecté que la pyriméthamine car les deux molécules ont des sites actifs différents (Warhurst, 2002). D'autres mutations rares, associées à un haut niveau de résistance comparable à celui observé avec la mutation au locus Ile-164-Leu, ont été mises en évidence dans un modèle expérimentale de levure. Ce sont les mutations aux loci Asn-188-Lys, Ser-189-Arg et Val-213-Ala (Bates *et al.*, 2004).

Au niveau de la conformation de l'enzyme PfDHFR, la résistance résulte de la modification de la structure planaire de la pyriméthamine entraînant un mauvais ajustement au site actif de l'enzyme (Foote *et al.* 1994). Lorsque l'enzyme PfDHFR porte la mutation Ser-108-Asn, la structure planaire est modifiée. Le groupement amine -NH₂ de l'asparagine situé au niveau du site actif de l'enzyme muté interfère alors avec le chlore de la pyriméthamine (Warhurst, 1998, 2002). Des interactions de résidus polaires entre Ile-51, Arg-59 et la pyriméthamine protonée peuvent empêcher l'accès de l'inhibiteur à son site actif (Santos-Filho *et al.*, 2001 ; Warhurst, 2002). Cependant, cet effet n'est pas perceptible en l'absence de la mutation Ser-108-Asn. La cinétique confirme une résistance à la pyriméthamine très marquée lorsque l'enzyme porte en plus la mutation au locus Ile-164-Leu (Sirawaraporn *et al.*, 1997a).

La composition chimique et la conformation du site actif fixent la spécificité de la réaction catalysée par l'enzyme. Le site actif est composé d'un site de liaison, comprenant les acides aminés venant au contact du substrat, et d'un site catalytique composée des résidus jouant le jeu du mécanisme catalytique. Mais la fixation du substrat et la rupture de liaison jouent toutes deux un rôle inséparable dans la catalyse enzymatique (Rawn, 1999).

1.9.3.3.2 - Marqueurs de résistance à la Sulfadoxine

La pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase ou PfDHPS est une enzyme bifonctionnelle polypeptidique contrôlée par un gène qui code aussi pour la 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterine pyrophosphokinase, l'enzyme qui succède immédiatement la PfDHPS dans la voie de la

biosynthèse des folates (Brooks *et al.*, 1994; Triglia et Cowman, 1994). La PfdHPS catalyse la condensation de l'acide para-amino-benzoïque avec le 6-hydroxymethyldihydroptérine pyrophosphate pour donner le 7,8-dihydroptéroate. La compétition avec la PfdHPS chez les plasmodies a pour conséquence la déplétion du précurseur du désoxythymidine triphosphate (dTTP) et la baisse consécutive de la production d'ADN (Gregson et Plowe, 2005) (Figure 4).

Des points de mutation à l'intérieur de régions conservées de la protéine PfdHPS confèrent la résistance aux sulfonamides. Les mutations Ser-436-Ala/Phe, Ala-437-Gly, Ala-581-Gly et Ala-613-Thr/Ser ont été découvertes dans la séquence du gène *pf dhps*. Des niveaux très élevés de résistance aux sulfonamides ont été mis en évidence sur des isolats portant la double mutation - Ser-436-Phe et Ala-613-Ser/Thr, ou la mutation Ala-581-Gly. La première étude sur isolat de terrain portant la mutation Lys-540-Glu a été décrite en 1997. Cette mutation est associée à Ala-437-Gly (Plowe *et al.*, 1997; Triglia *et al.*, 1997). Dans d'autres isolats de terrain provenant du Kenya, une mutation trimorphique en position 613 a été détectée avec l'allèle sensible Ala, ou les allèles mutés Thr ou Ser (Brooks *et al.*, 1994; Nzila *et al.*, 2000a). La mutation au codon 436 a, quant à elle, été sujette à controverse. Pour certains, les polymorphismes en position 436, Ser-436-Ala/Phe, sont des types sauvage alternatifs (Nzila *et al.*, 2000a). Pour les autres, ils contribuent à un faible niveau de résistance aux sulfonamides (Brooks *et al.*, 1994; Triglia *et al.*, 1997).

D'autres mutations de PfdHPS n'apparaissent pas en présence de Ser-436-Ala/Phe (Plowe *et al.*, 1997). En effet, la sélection de parasites portant la mutation Ala-437-Gly et non Ser-436-Ala/Phe ainsi que la réversion de Ser-436-Phe vers PfdHPS AGKAA a été mise en évidence à la suite de la prise en charge d'enfants kenyans à la SP (Nzila *et al.*, 2000a). *In vitro*, des isolats portant le génotype PfdHPS AGKAA résistent plus aux sulfonamides que les parasites portant la mutation Ala-437-Gly seule (Triglia *et al.*, 1997). Des CI50 plus grandes ont été obtenues pour des parasites portant le génotype PfdHPS AGKAA que pour ceux portant la mutation Ala-437-Gly seule (Mberu *et al.*, 2002). La mutation au codon Ser-436-Ala a été associée à la résistance aux sulfonamides dans les populations issues des zones de faible endémicité au paludisme (Khalil *et al.*, 2002). Tandis qu'un haut niveau de résistance est peu probable d'apparaître en présence de la mutation Ser-436-Ala/Phe seule, une mutation à ce codon en présence de mutations aux autres codons contribue à un faible niveau de résistance aux sulfonamides (Gregson et Plowe, 2005). La substitution de Val par Iso en position 431 a été mise en évidence au Royaume-Uni chez des voyageurs d'origine nigériane. La mutation Val-431-Iso a été retrouvée associée uniquement aux mutations Gly-581-Ala et Ser-436-Ala, probablement à cause de contraintes fonctionnelles de l'enzyme PfdHPS. Elle est retrouvée en effet dans les haplotypes PfdHPS VSGKGS et VSGKAA. Cette nouvelle mutation pourrait avoir été sélectionnée à cause de la forte pression de

TS, le médicament largement préconisé en prophylaxie chez les personnes atteintes de VIH. Cependant, son rôle précis dans la résistance à la Sulfadoxine n'a pas encore été déterminé (Sutherland *et al.*, 2009).

Le rôle des mutations de PfDHPS dans la résistance aux sulfonamides a été démontré de façon univoque avec l'expression de plasmide portant différentes mutations du gène *pfdhps*. Le transfert de gènes s'est fait par échanges alléliques chez *P. falciparum* (Triglia *et al.*, 1998). La mutation Ala-437-Gly seule ou en combinaison avec Ala-581-Gly provoque une augmentation de 5 fois la CI50 de la Sulfadoxine comparée à l'enzyme de type sauvage. Le génotype PfDHPS **AGKAA** l'est 6 fois plus, tandis que les génotypes PfDHPS **AGEAA** et PfDHPS **FGKAS** le sont 10 et environ 24 fois plus, respectivement. Les mutations aux codons 581 et 613 se compensent au niveau fonctionnel, ce qui explique que les deux ne soient pas observées à la fois dans les isolats, mais seulement avec les mutations aux codons 436, 437 ou 540. Des niveaux très élevés de résistance aux sulfonamides requièrent donc la présence de mutations multiples, en plus de mutations aux codons 436, 437 et/ou 540. Ainsi, il apparaît qu'une mutation à n'importe lequel de ces trois codons est nécessaire pour la résistance aux sulfonamides.

1.9.3.3.3 - Marqueurs de résistance à la Chloroquine

Le phénotype « résistance à la CQ » se manifeste par une faible accumulation de la CQ dans la vacuole digestive. L'un des facteurs favorisant cette résistance est la réduction de la concentration vacuolaire en CQ en-dessous du niveau requis pour inhiber la biominéralisation (Cabrera *et al.*, 2009). La protéine de transport de la CQ de *P. falciparum* (PfCRT) codée par le gène *pfcr*t du chromosome 7 est une protéine transmembranaire de la vacuole digestive située à l'interface entre le cytoplasme et la vacuole digestive (Fidock *et al.*, 2000 ; Sidhu *et al.*, 2002). Son rôle exact n'est pas encore élucidé (**Figure 4**).

La protéine pourrait jouer soit le rôle de canal, soit celui de protéine transporteuse (Bray *et al.*, 2006). Cependant, le dernier modèle semble mieux expliquer les mouvements de la CQ en absence d'énergie métabolique : son affinité pour son substrat, sa translocation avec des changements de conformations, puis la libération du substrat dans la vacuole (Sanchez *et al.*, 2007b ; Lehane *et al.*, 2008 ; Lehane et Kirk, 2008).

Plusieurs mutations impliquées dans la modulation du niveau de la résistance à la CQ ont été détectées de façon progressive au niveau du gène *pfcr*t. Une forme du gène *pfcr*t portant la mutation Thr-76 combinée au type sauvage Ala-220 a été identifiée au Cambodge (Lim *et al.*, 2003). De façon concordante, aux Philippines de nouvelles mutations Ala-144-Thr et Leu-160-Tyr ont été découvertes associées à Lys-76-Thr mais sans la mutation Ser-220. Ces nouvelles mutations compensent la mutation Ser-220 (Chen *et al.*, 2003). Toujours au Cambodge, la

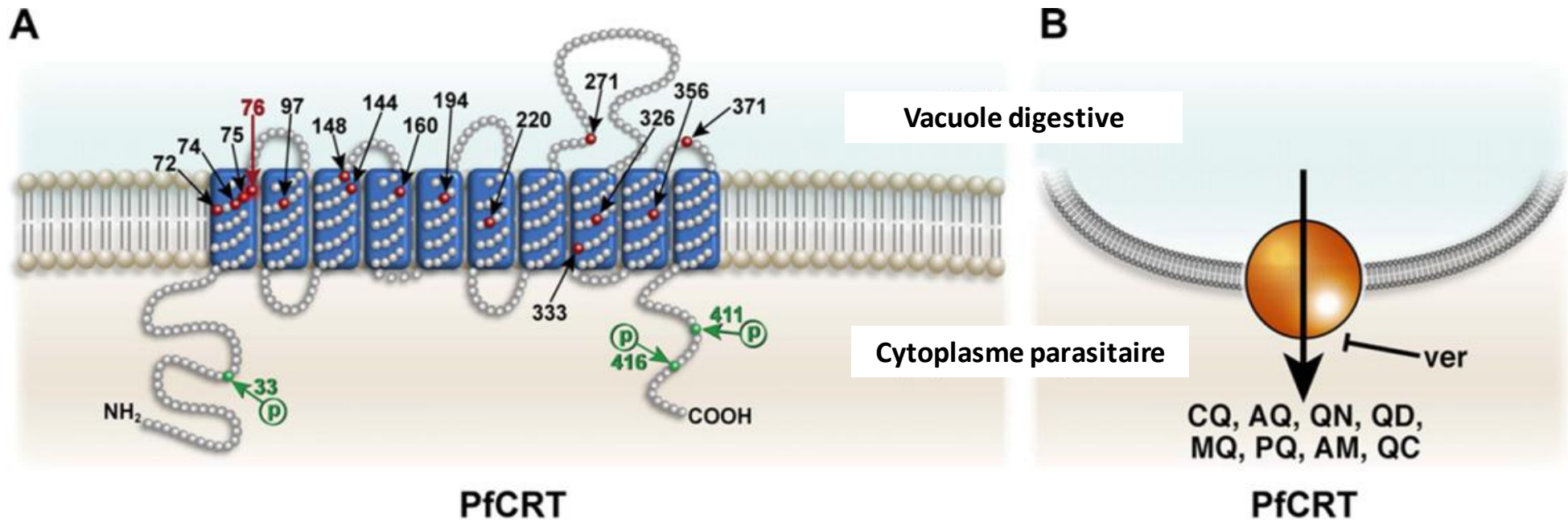


Figure 4. Topologie et fonction de la PfCRT.

Adapté de Sanchez *et al.* (2010)

Note : A) Modèle topologique de la PfCRT. Les acides aminés polymorphes sont indiqués par les flèches noires. La substitution Lys-76-Thr, retrouvée chez les parasites CQR est indiquée par une flèche rouge. Les résidus qui peuvent être phosphorylés sont indiqués en vert.

(B) Substrats éventuels de la PfCRT. La PfCRT exporte les molécules à l'extérieur de la vacuole digestive dans laquelle elles s'accumulent, adapté Sanchez *et al.* (2010). La Vérapamine (Ver) bloque l'activité de la PfCRT, adapté de Ferdig *et al.* (2004).

découverte d'allèles associant de façon systématique la mutation Ala-144-Phe à d'autres nouvelles mutations Ala-148-Ile, Ile-194-Thr, Thr-333-Ser, indique que plusieurs combinaisons de mutations peuvent produire une protéine PfCRT fonctionnelle.

Cependant, de très fortes contraintes biologiques apparaissent entre ces mutations. Une forte liaison a en effet été identifiée entre les mutations aux positions 74-76, 220 et 271 indiquant que certaines d'entre elles sont secondaires à un événement moléculaire majeur et non fréquent pouvant affecter plusieurs codons simultanément. Des travaux réalisés en Amérique du Sud rapportent l'existence de parasites CQR portant des mutations uniques aux positions 76 et 220, démontrant ainsi leur nature déterminante dans l'expression de la CQR (Fidock *et al.*, 2000).

Enfin, un lien significatif entre la mutation *pfcr*t Thr-76 de *P. falciparum* et le développement de la CQR au cours de la prise en charge du paludisme a été démontré (Djimé *et al.*, 2001). Cette mutation peut donc être considérée comme marqueur de résistance à la CQ.

1.9.3.3.4 - Marqueurs de résistance à la Quinine

L'émergence de résistances croisées à la QN, à la Méfloquine et à la Lumefantrine a suscité l'idée d'un mécanisme moléculaire de résistance commun à plusieurs molécules. L'étude des QTL a révélé que des loci des gènes impliqués dans la résistance à la QN se trouvent sur les chromosomes 5, 7 et 13 du génome de *P. falciparum*. Ces loci correspondent aux gènes *pfmdr1* et *pfcr*t et codant chacune pour une protéine de transport localisée au niveau de la membrane de la vacuole digestive se trouve sur les chromosomes 5 et 7 (Ferdig *et al.*, 2004). Le chromosome 13 correspond au gène *pfhne-1* (Nkrumah *et al.*, 2010). Cependant, l'implication réelle de la mutation Thr-76 du gène *pfcr*t dans la perte de la sensibilité de la QN reste controversée avec des résultats variant en fonction des zones d'étude. Le nombre de copies de gène *pfmdr1* a été aussi évoqué dans la baisse de la sensibilité à la QN, à la Méfloquine et à la Lumefantrine.

D'autres protéines transmembranaires modulant l'activité de la QN ont été mises en évidence. Le plus important est la protéine d'échange et de transport du couple Na⁺/H⁺ codée par le gène *pfhne-1* (Nkrumah *et al.*, 2010). La plupart des parasites de sensibilité réduite à la QN et émergeant en Afrique portent deux copies de la séquence répétée DNNND du microsatellite ms4067 du gène *pfhne* en combinaison avec des mutations apparaissant aux codons N1042D, S1034C or D1246Y du gène *pfmdr1* (Ferdig *et al.*, 2004 ; Nkrumah *et al.*, 2010 ; Okombo *et al.*, 2011). Cependant, une baisse de la sensibilité de la QN n'est pas toujours corrélée à des variations du marqueur *pfhne-1*. Tous ces travaux indiquent que la résistance à la QN est un trait complexe qui exige la contribution des trois transporteurs PfCRT, PfMDR-1, PfNHE-1 (Andriantsoanirina *et al.*, 2009 ; Baliraine *et al.*, 2011; Briolant *et al.*, 2011).

1.9.3.4 - Répartition actuelle des marqueurs de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine

Les mutations Ser-108-Asn, Cys-59-Arg et Asn-51-Ile du gène *pfdhfr* d'une part, les mutations Ala-437-Gly et Lys-540 Glu du gène *pfdhps* d'autre part, comptent parmi les marqueurs moléculaires les mieux corrélés aux échecs thérapeutiques à la SP (Eboumbou-Moukoko *et al.*, 2009). Des différences régionales marquées ont été mises en évidence au sein des génotypes responsables de la résistance à la SP grâce à une cartographie de récentes surveillances des mutations de la dihydrofolate réductase (*pfdhfr*) et de la dihydroptéroate synthase (*pfdhps*). En Afrique de l'Ouest, la combinaison de PfdHFR N51I, N59R, S108N et PfdHPS A437G dite « partiellement résistante » prédomine. En Afrique de l'Est, la combinaison de PfdHFR N51I, N59R, S108N et PfdHPS A437G + K540E dite « totalement résistante » a été mise en évidence (Naidoo et Roper, 2013). Les figures 5 et 6 représentent leurs répartitions respectives en Afrique.

1.10 -Analyse des marqueurs moléculaires de résistances

1.10.1 - Séquençage par hybridation

Le séquençage par hybridation est une méthode de haut débit permettant de détecter les polymorphismes grâce à la spécificité d'hybridation avec de petits oligonucléotides présents sur une puce. Une fois qu'une série de SNP a été identifiée, elle peut servir pour faire un alignement sur des oligonucléotides correspondants, qui constituera un autre détecteur de SNP (Cramer *et al.*, 2007 ; Ibrahim *et al.* 2009).

1.10.2 - Méthodes de génotypage en basse technologie

Les méthodes de génotypage en basse technologie reposent sur une amplification de la séquence d'ADN entourant le site à génotyper. Parmi les méthodes de génotypage en basse technologie, il y a l'hybridation d'oligonucléotides allèle-spécifique, ou ASO, qui peut se pratiquer sur une membrane ou sur une plaque de microtitration, les snip-SNP (Felger et Beck, 2002) qui sont des SNP touchant des sites de coupure d'un enzyme de restriction dans un court fragment produit par PCR. Il existe des technologies de criblage des SNP dont les méthodes de mini-séquençage et d'extension de simples nucléotides sur micro-alignement (Hirschhorn *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2006), de séparation par électrophorèse et d'évaluations sur microbilles.

1.10.3 - Cas du pyroséquençage

1.10.3.1 - Principe

Le Pyroséquençage™ (Biotage, Charlottesville, VA) est une méthode de mini-séquençage. Il consiste à effectuer en parallèle, 96 réactions de micro-séquençage en plaque de 96 puits, en utilisant la fluorescence pour détecter l'addition en temps réel de chaque nucléotide sur une

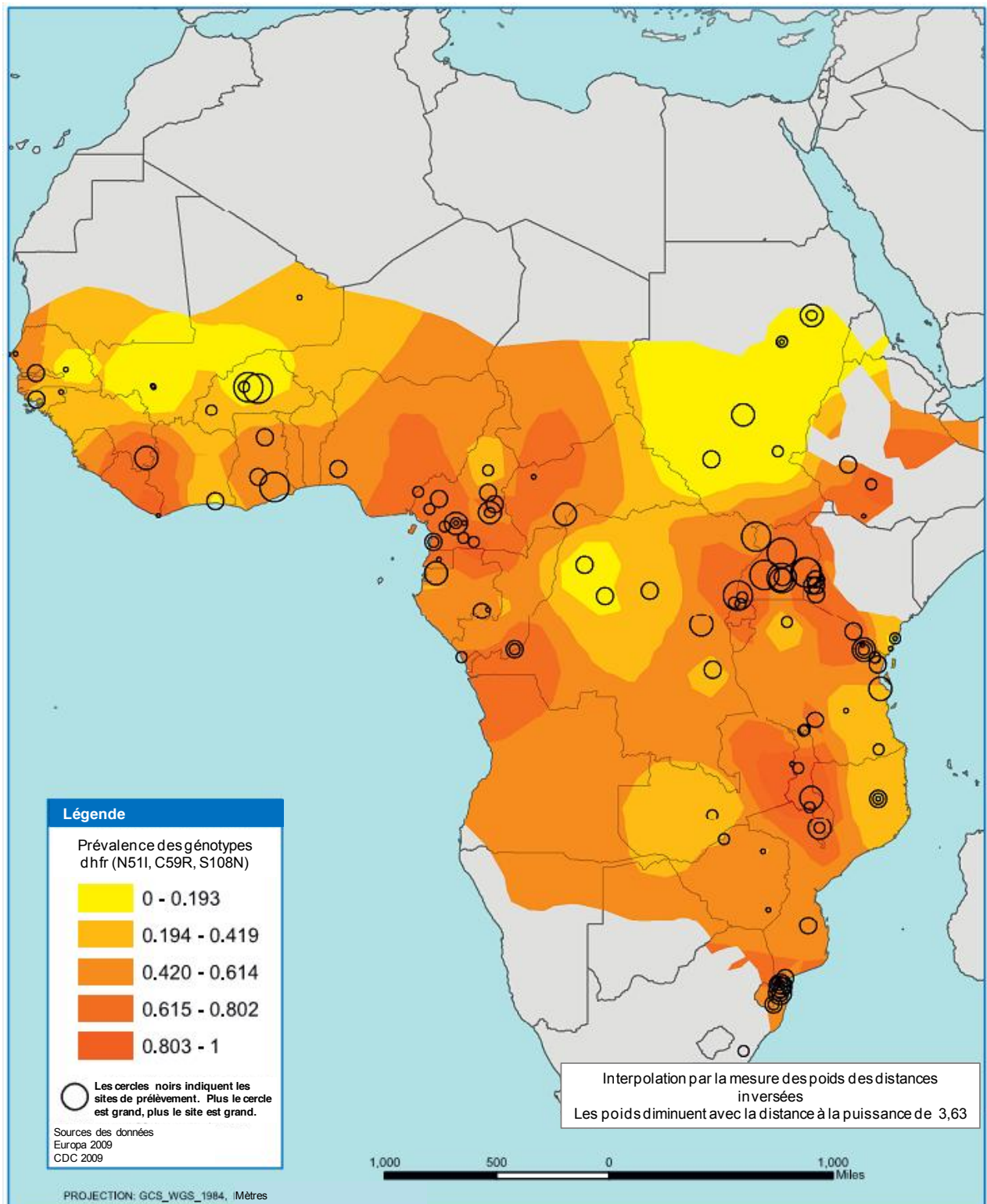


Figure 5. Prévalence du triple mutant *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N) en Afrique.

Adapté de Sridaran *et al.* (2010)

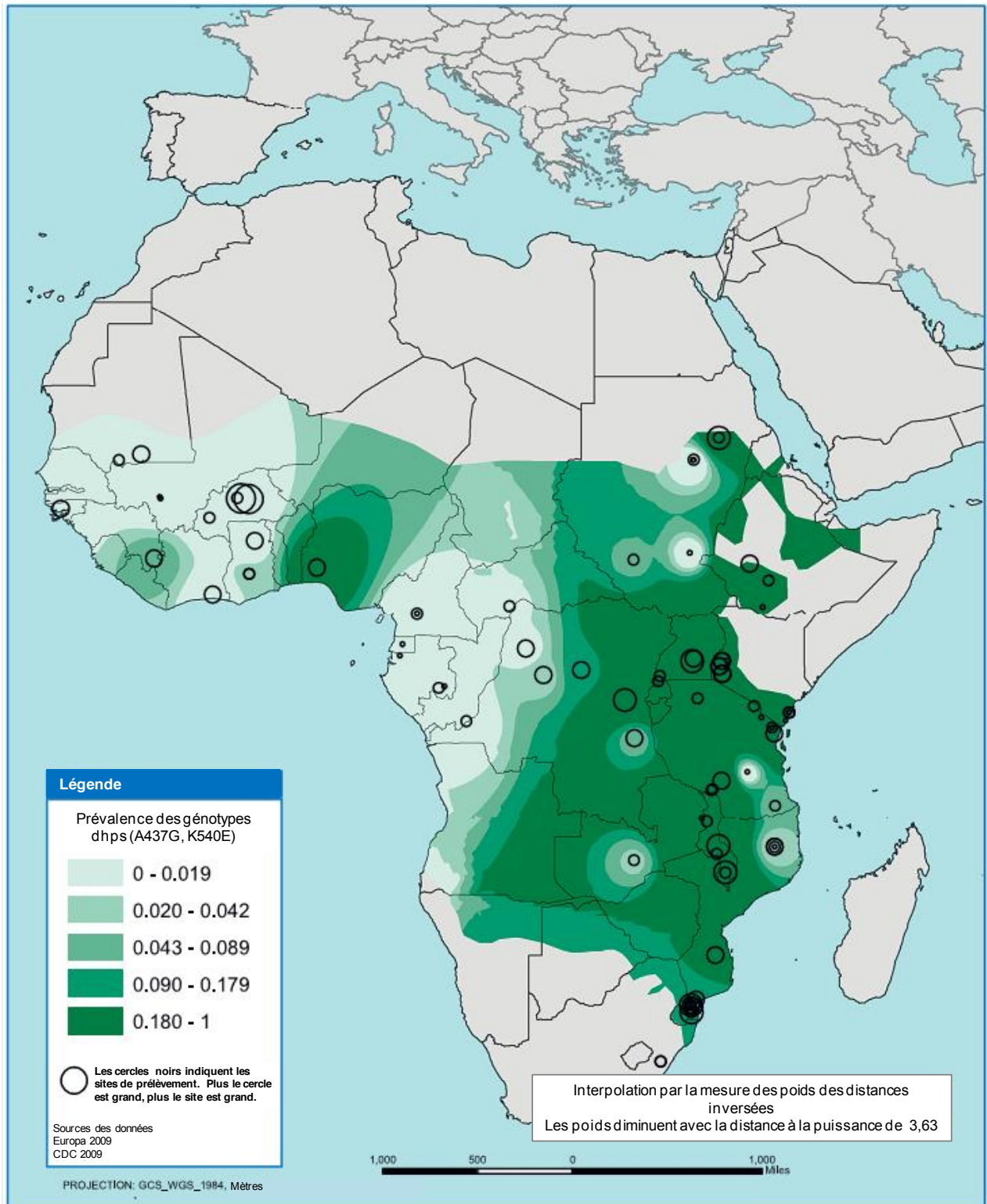


Figure 6. Prévalence du double mutant *pf dhps* (A437G, K540E) en Afrique.

Adapté de Sridaran *et al.* (2010)

amorce. Les nucléotides sont ajoutés et enlevés des micro-puits par cycles. La fluorescence détectée provient du clivage enzymatique du pyrophosphate libéré à partir d'un dNTP qui se polymérise sur la chaîne en cours d'extension. La réaction se produit en 5 étapes (Ronaghi, 2001 ; Zhou *et al.*, 2006 ; Cheesman *et al.*, 2007).

Étape 1. Une amorce de séquençage est hybridée à un brin monocaténaire d'amplicon PCR qui sert de matrice et incubée avec les enzymes ADN polymérase, sulfurylase ATP, la luciférase, l'apyrase ainsi que les substrats l'adénosine 5' phosphosulfate (APS) et la luciférine.

Étape 2. Le déoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) est ajouté à la réaction. L'ADN polymérase catalyse l'incorporation du triphosphate désoxyribonucleotide dans le brin d'ADN, si elle est complémentaire à la base dans le brin matrice. Chaque événement est accompagné d'incorporation par la libération de pyrophosphate inorganique ou PPi en une quantité équimolaire de la quantité de séquences de nucléotides incorporés.

Étape 3. La sulfurylase ATP convertit le PPi en ATP en présence d'adénosine 5' phosphosulfate, ou APS. Cet ATP entraîne la conversion luciférase-induite de la luciférine en oxyluciférine qui génère de la lumière visible dans des quantités proportionnelles à la quantité d'ATP. La lumière produite dans la réaction catalysée par la luciférase est détectée par un dispositif à couplage de charge, CCD, à puce et considéré comme un pic dans la production de données brutes, ou pyrogramme. La lumière est détectée en 3-4 secondes après le début de la polymérisation. En effet, 1 pmol d'ADN comporte 6×10^{11} molécules d'ATP qui peuvent générer plus de 6×10^9 photons à 560 nm, quantité de lumière facilement détectable par le capteur CCD incorporé au pyroséquenceur (Ronaghi, 2001)

Étape 4. L'Apyrase, une enzyme dégradant les nucléotides, dégrade en continu les nucléotides non incorporés et l'ATP. Lorsque la dégradation est terminée, un autre nucléotide est ajouté.

Étape 5. L'addition des dNTP se fait de façon séquentielle. Le désoxyadénosine alpha-thio triphosphate (dATP- α S) est utilisé comme substituant du désoxyadénosine triphosphate (dATP) naturel puisqu'elle est plus efficacement utilisée par l'ADN polymérase, mais n'est pas reconnu par la luciférase. Tout au long du processus, le brin complémentaire d'ADN est construit et la séquence de nucléotides est déterminée à partir des pics des signaux lumineux dans le pyrogramme. La hauteur de chaque signal lumineux est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. Un nouveau cycle peut être ainsi entamé par addition de nucléotide suivant (Gibson et Muse, 2004).

La stratégie du pyroséquençage en phase solide utilise de l'ADN immobilisé et un système à quatre enzymes (Ronaghi *et al.*, 1996) que sont :

- le fragment de Klenow de *Escherichia coli* DNA Pol I, une polymérase lente (Klenow *et al.*, 1971 ; Benkovic et Cameron, 1995) ;
- l'ATP sulfurylase, un recombinant de la version retrouvée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Segel *et al.*, 1987 ; Karamohamed *et al.*, 1999) ;
- la luciférase d'une luciole américaine *Photinus pyralis* (Deluca, 1976) ;
- l'apyrase dont la forme commercialisée actuelle provient des tubercules de pomme de terre *Solanum tuberosum* (Komoszynski et Wojtczak, 1996) et a pour rôle essentiel de dégrader des nucléotides non incorporés et des excès d'ATP entre additions de bases.

1.10.3.2 - Avantages

La technologie du pyroséquençage fait l'économie des étapes d'amplification par PCR (Mullis *et al.*, 1986) et de purification manuelle à l'éthanol qui précèdent l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette dernière étape de purification manuelle est remplacée par une purification magnétique de l'ADN au moyen de microbilles magnétiques combinées à de la streptavidine-biotine (Wahlberg *et al.*, 1992). La streptavidine est une protéine tétramérique qui se lie à la biotine. Elle est produite par *Streptomyces avidinii* et peut lier jusqu'à quatre molécules de biotine par molécule. Elle est utilisée, entre autres, pour détecter des sondes à ADN fixées à la biotine. Le complexe microbille magnétique et streptavidine-biotine ne retient que l'ADN biotinylé puisque la biotine est fixée à l'une des extrémités des amorces d'amplification de pyroséquençage. Le pyroséquençage permet un gain de temps important pour l'identification de variant génétiques. Cette méthode très attractive a déjà été utilisée avec succès (Zhou *et al.*, 2006 ; McCollum *et al.*, 2007 ; Takala *et al.*, 2007). Le pyroséquençage permet de séquencer des fragments d'environ 20 pb.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1 - Matériel

2.1.1 - Sites d'étude

2.1.1.1 - Anonkoua-kouté

Anonkoua-kouté (5°25'55.90" N ; 4 02'45.27" W) est un village périurbain du district sanitaire d'Abobo-Nord à Abidjan. Il est situé à environ 5 km de la commune d'Abobo (**Figure 7**). Les précipitations annuelles y excèdent 1700 mm de pluie et la température varie entre 27 et 33 °C. Le village s'est doté d'une formation sanitaire urbaine à base communautaire, ou FSUCOM, qui sert une population estimée à 61.250 habitants en 2008. Cette année-là, 18.281 cas de paludisme ont été enregistrés sur un total de 33.727 consultations, soit 54,20 % des consultations médicales. La FSUCOM d'Anonkoua-kouté a été retenue pour cette étude à cause des incidences annuelles constamment élevées des cas de paludisme. En outre, la formation sanitaire a été considérée pendant plusieurs années comme le site principal de réalisation tests cliniques multicentriques d'efficacité de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

2.1.1.2 - Bonoua

Bonoua (5°16'16.24" N; 3°35'38.13" W) est au bord du fleuve Comoé, au Sud-est du département d'Abidjan, dans une zone de forêt humide. La ville s'étend sur une superficie de 1.200 km² et est limitée au Sud par l'océan Atlantique et la commune de Grand-Bassam, au Sud-est par Adiaké, au Nord-est par Aboisso et au Nord-Ouest par Alépé. Les autochtones ivoiriens constituent la population dominante, essentiellement concentrées à Bonoua ville, Yaou et Adiaho. Ils sont estimés à 65 % de la population totale de la localité de Bonoua. Les allogènes et étrangers essentiellement africains, avec une prédominance de ressortissants burkinabés et ghanéens, représentent quant à eux 35 % de la population. Située à 59 km d'Abidjan et à 17 km de Grand-Bassam, Bonoua est dotée d'un hôpital général de deuxième catégorie qui reçoit près de 48 % des malades de la commune ainsi que ceux des villages environnants dont Samo (**Figure 7**).

2.1.1.3 - Samo

Samo (5°28'75.24" N; 3°51'77.90" W) est un village de la sous-préfecture de Bonoua, situé à 8 km de la ville de Bonoua sur l'axe Abidjan-Aboisso. Les localités de Samo et de Bonoua sont traversées par l'axe routier international Abidjan-Lagos, appelé 'la côtière' reliant les côtes maritimes ivoiriennes à celles des pays de la sous-région comme le Ghana, le Togo et le Benin, ayant l'océan atlantique comme frontière maritime commune. Grâce à la côtière, Samo a été le lieu d'un important flux migratoire. Dans les années 2000, la culture et les industries de l'ananas *Ananas comosus* y ont été très florissantes ([Willems, 2006](#) ; [Colin et al., 2007](#)). Samo est à un

carrefour stratégique entre Alépé, Bonoua et Adiaké. Le village dispose d'un centre de santé comprenant une infirmerie et une maternité. Des taux élevés de résistance à la CQ ont été relevés dans cette région en 2006 avec 63,60 % de taux d'échec (Menan *et al.*, 2007). Des tests d'efficacité y ont été conduits (Penali et Jansen, 2008 ; Penali *et al.*, 2009). (Figure 7).

2.1.1.4 - Ayamé

La commune d'Ayamé (5°36'12,43" N ; 3°09'19,36" W) (Figure 7) a été choisie comme site d'étude pour son faciès épidémiologique de type équatorial, son hydrographie et sa végétation propices à une forte densité anophélienne. Un taux élevé d'échec à la CQ de plus de 60 % a été révélé en 2003 à Aboisso, non loin d'Ayamé (Menan *et al.*, 2007).

2.1.1.5 - Dabakala

Dabakala (8°22'00,00" N ; 4°26'00,00" W) et les localités du même district telles que M'Borla-Dioulasso, Bokala Napondougou, Tagbonnon et Bambarasso, ont été sélectionnées pour cette étude. Le faciès épidémiologique y est de type tropical (Mouchet *et al.*, 2004). Une prévalence de 13,4 % de la parasitémie palustre a été rapportée chez des enfants de moins de 5 ans dans la région centre-nord à laquelle appartient ce district (Anonyme-4, 2012). A l'instar des autres localités du Nord de la Côte d'Ivoire, Dabakala manque de données relatives à l'épidémiologie moléculaires du paludisme simple à *P. falciparum*. La localité représente un des sites sentinelles du programme national de lutte contre le paludisme. En outre, le district étant au Nord, zone difficile d'accès pendant la crise sociopolitique en Côte d'Ivoire, les échantillons de ces localités et leur analyse au cours de cette étude permettra d'avoir une idée du niveau de sensibilité des isolats du Nord aux antipaludiques usuels (Figure 7).

2.1.2 - Populations et périodes d'étude

La première partie de l'étude a été réalisée avec des échantillons collectés à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo en vue de déterminer le polymorphisme génétique des marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et à la CQ. Les fréquences des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ ont d'abord été comparées entre individus asymptomatiques et patients symptomatiques issus d'un même faciès épidémiologique. Le **tableau I** présente l'ensemble des échantillons décrits ci-dessus. Ils ont été analysés dans le laboratoire de génétique de l'Université de Washington à Seattle (WA, USA).

2.1.2.1 - Individus asymptomatiques

Les individus asymptomatiques sont des écoliers asymptomatiques âgés de 4 à 15 ans fréquentant 3 écoles primaires d'Anonkoua-kouté (EPP Anonkoua-kouté I, II et IV), ayant une température axillaire inférieure à 37,5 °C ne présentant aucun signes évocateurs ni de symptômes d'aucune



Figure 7. Carte présentant la localisation des sites d'étude.

Tableau I. Echantillons utilisés dans l'analyse moléculaires des marqueurs de la résistance à la SP et à la CQ à Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo.

Sites	Période de collecte	Type d'échantillons	Confetti collectés	Tranches d'âge	Confetti amplifiés
Bonoua	Mai-août 2005	Essai Clinique	69	≥ 2 ans	48
Samo	Mai-août 2005	Essai Clinique	63	≥ 2 ans	49
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Nov. 2007 – Août 2008	Essai Clinique	150	4 – 59 mois	34
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Juin – octobre 2008	Essai Clinique	86	4 – 13 ans	32
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Avril – juin 2008	Enquête Asymptomatiques	96	4 – 15 ans	48
Total			464		211

Note : Les échantillons dont l'extraction d'ADN a été réalisée à Anonkoua-kouté au cours des deux essais cliniques de 2008 correspondent à ceux dont l'âge des individus dont ils sont issus est compris dans la tranche 4-13 ans. Pour les échantillons issus d'individus asymptomatiques, 45 individus n'ont pu être amplifié avec succès à cause de leur faible densité parasitaire (< 500 parasites asexués/ μ L de sang).

forme de paludisme. Aucune prise antérieure d'antipaludique n'a été signalée au cours de l'enquête. Le consentement écrit préalable des parents a été obtenu de façon volontaire avant l'admission des participants dans l'étude. Les prélèvements ont été réalisés d'avril à juin 2008

2.1.2.2 - *Individus symptomatiques*

Les individus symptomatiques sont des enfants des deux sexes, âgés de 4 à 13 ans venus en consultation à la FSUCOM du village avec des signes cliniques évocateurs de paludisme simple. Les enfants souffrant de malnutrition sévère n'ont pas été inclus dans l'étude. Il en a été de même pour ceux ayant des signes d'altération de l'état général ou des signes de paludisme grave, un état fébrile dû à une maladie autre que le paludisme, des antécédents de réaction d'hypersensibilité aux associations thérapeutiques testées ou à l'un des constituants, ayant pris un antipaludique ou un médicament à activité antiplasmodiale connue dans la semaine précédant la consultation médicale. Les échantillons de participants symptomatiques ont été collectés au cours d'un essai clinique réalisé de juin à octobre 2008. Le faible effectif de ces derniers échantillons a été complété avec des isolats issus d'individus symptomatiques ayant participé à une étude clinique réalisée entre novembre 2007 et août 2008 sous la conduite de l'Unité de Paludologie.

Les fréquences des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ ont ensuite été comparées entre individus symptomatiques de plus de 2 ans venus en consultation à l'Hôpital Général de Bonoua, en zone urbaine où ces deux molécules sont plus accessibles ou au Centre de Santé de Samo en zone rurale. Les échantillons ainsi décrits ont été collectés au cours d'un essai clinique multicentrique mis en œuvre de février à avril 2005 par l'Unité de Paludologie.

Dans la seconde partie de l'étude, pour décrire la répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ, les proportions des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ ont été comparées entre Anonkoua-kouté et Ayamé au Sud et Dabakala au Nord. Les fréquences ont été déterminées à partir d'échantillons collectés au cours d'un test multicentrique d'efficacité clinique réalisé simultanément entre novembre 2008 et février 2009 à Ayamé et à Dabakala chez des enfants symptomatiques âgés de 6 à 59 mois. L'étude clinique a été menée par l'Unité de Paludologie.

L'évolution des résistances a été analysée à l'aide d'une collection d'échantillons obtenus à Anonkoua-kouté d'août 2002 à octobre 2008 et correspondant à des isolats de patients symptomatiques âgés d'au moins 6 mois. Les périodes de déroulement des essais cliniques dont sont issus les échantillons de cette étude sont décrits au **tableau II**.

Dans la troisième partie de l'étude, pour déterminer la complexité des infections à *Plasmodium falciparum* à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala, des échantillons d'Anonkoua-kouté collectés en 2002-2003 et 2008 ont été utilisés. Les échantillons issus d'Ayamé au Sud et Dabakala au Nord

Tableau II. Echantillons utilisés pour l'étude de la répartition géographique et de la dynamique des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ en Côte d'Ivoire au cours de la période 2002-2008.

Sites d'étude	Périodes de collecte	Tranches d'âge	Confettis collectés	Extraits purs d'ADN	Extraits amplifiés avec succès
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Aout 2002 - Oct. 2003	19 - 69 ans	148	148	143
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Oct. 2005 - Jan. 2006	6 - 59 mois	196	104	100
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Fév. - Avril 2005	6 mois - 38 ans	144	68	67
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Juin - Sept. 2007	6 - 59 mois	156	104	103
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Juil. - Oct. 2008	4 - 13 ans	86	84	80
Ayamé	Nov. 2008 - Fév. 2009	6 - 59 mois	120	98	98
Dabakala	Nov. 2008 - Fév. 2009	6 - 59 mois	141	120	117
Total			991	726	708

et obtenus dans la période 2008-2009 ont aussi été utilisés (**Tableau III**).

2.1.3 - Gènes étudiés

Pour le gène *pfdhfr* [PF0830w ([http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/Gène /9221804](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gène/9221804))] situé sur le chromosome 4, une séquence de 793 pb a été amplifiée par nested-PCR avec des amorces développées par le laboratoire d'accueil et synthétisées par InvitrogenTM. La séquence contient les loci Val-16-Ala, Cys-50-Arg, Asn-51-Ile, Cys-59-Arg, Ser-108-Asn ou Ser-108-Thr et Ile-164-Leu dont les allèles mutants sont tous des déterminants génétiques de la résistance à la pyriméthamine (Peterson *et al.*, 1988 ; Cowman *et al.*, 1998).

Il y a également le gène *pfdhps* [PF08_0095([http ://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene))] (situé sur le chromosome 8) dont la séquence d'intérêt de 753 pb a pu être amplifiée par nested-PCR. Cette séquence porte les déterminants génétiques de la résistance à la Sulfadoxine aux codons Ser-436-Ala, Ala-437-Gly, Lys-540-Glu, Ala-581-Gly et Ala-613-Ser (Brooks *et al.*, 1994 ; Triglia et Cowman, 1994). En ce qui concerne l'exon 2 du gène *pfprt* situé sur le chromosome 7 [MAL7P1.27 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)], séquence de 400 pb portant les déterminants génétiques de la résistance à la CQ, c'est-à-dire Cys-72-Ser, Met-74-Ile, Asn-75-Glu, Lys-76-Thr (Wellems et Plowe, 2001) a été obtenue par PCR classique.

2.1.4 - Microsatellites analysés

Trois marqueurs microsatellites ont été utilisés dans l'analyse de la complexité des infections à *P. falciparum*. Chacun d'eux est caractérisé par des séquences de base composées de trois nucléotides répétés en tandem. Ce sont les microsatellites Poly- α , TA81 et PfpK2 (**Tableau IV**). Trois amorces correspondant chacun à un des microsatellites utilisés ont été adaptées et préparées selon la procédure décrite par Anderson *et al.* (1999). Ces amorces ont la composition suivante :

- un couple d'amorces externes à utiliser pour la PCR multiplex
- une amorce interne marquée au fluorochrome HEX (couleur verte) à l'extrémité 5' et complémentaire d'une des amorces externes à utiliser pour l'hémi-nested PCR.

2.1.5 - Questions éthiques et réglementaires

Cette étude a été menée conformément au protocole et à la déclaration d'Helsinki concernant la recherche médicale sur l'Homme (*Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research involving Human Subjects*, Helsinki 1964, amendements de Tokyo 1975, Venise 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1986, Edinburgh 2000, Washington 2002, Tokyo 2004 et Seoul 2008). Un consentement oral puis écrit a été obtenu des parents ou des représentants légaux de chaque enfant enrôlé dans l'étude. Le consentement est obtenu après les avoir informés sur le protocole de l'étude, la nature des traitements à administrer, les risques encourus ou les bénéfices escomptés,

Tableau III. Périodes de collecte, sites d'étude et taille des échantillons.

Sites d'étude	Périodes de collecte	Tranches d'âge	Confettis collectés	Extraits purs d'ADN génomique obtenus	Extraits amplifiés avec succès
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Août 2002 - Oct. 2003	19 - 69 ans	148	148	143
Anonkoua-kouté (Abidjan)	Juil. - Oct. 2008	3 - 60 ans	86	84	80
Ayamé	Nov. 2008 - Fév. 2009	6 - 59 mois	120	98	98
Dabakala	Nov. 2008 - Fév. 2009	6 - 59 mois	141	120	117
Total			495	450	438

Tableau IV. Séquences des amorces de microsatellites utilisées en mono-injection.

Microsatellite	Chromosome	Code	Amorces	Séquences 5' - 3'	Intervalle de variation de la taille des allèles (pb)
Poly- α	4	LI8785	Poly- α -F Poly- α -3 (IR) Poly- α -R	AAA ATA TAG ACG AAC AGA HEX 5' GA AAT TAT AAC TCT ACC A ATC AGA TAA TTG TTG GTA	114-201
TA81	5	AF010510	TA81-R TA81-3F TAA81-F	TTT CAC ACA ACA CAG GAT T GAA GAA ATA AGG GAA GGT HEX 5' TG GAC AAA TGG GAA AGG ATA	112-142
PfPK2	12	X63648	PfPK2-F PfPK2-3R PfPK2-R	CTT TCA TCG ATA CTA CGA CCT CAG ACT GAA ATG CAT HEX 5' AA AGA AAG GAA CAA GCA GA	159-192

Note : Les séquences sont celles publiées par [Anderson *et al.*, 1999](#)

les responsabilités des accompagnateurs et des enfants. Les explications ont été fournies par l'investigateur principal de l'étude. La confidentialité des participants à l'étude a été respectée par le caractère anonyme des échantillons collectés. Le protocole de ce travail de thèse a reçu l'approbation du Comité National d'Éthique de Côte d'Ivoire.

2.2 - Méthodes

2.2.1 - Collecte et conservation des échantillons

Un échantillon représente un morceau rectangulaire de papier filtre *Whatman 3 MM* (Whatman Inc., Maidstone, United Kingdom) imbibé de gouttes de sang du participant. Trois gouttes de 20 μ L ont été déposées sur le papier filtre à partir de sang prélevé dans un tube EDTA à l'aide d'une micropipette (**Figure 8**).

2.2.1.1 - *Ecoliers asymptomatiques*

Pour chaque enfant, un test de diagnostic rapide du paludisme a été réalisé et la température axillaire a été notée. Les échantillons d'enfants ayant une température axillaire inférieure à 37,5 °C et une infection à *Plasmodium* confirmée par une goutte épaisse et un frottis sanguin positifs ont été utilisés au cours de cette étude.

Environ 2 à 3 mL de sang d'écoliers ont été recueillis dans un tube EDTA dans les trois écoles primaires et acheminés à l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire dans des glacières contenant des accumulateurs de froid. Une fois au laboratoire, trois gouttes de 20 μ L de sang ont été déposées sur du papier filtre *Whatman 3 MM* à l'aide d'une micropipette. Le papier contenant les spots de sang a été mis à sécher pendant environ 45 à 60 min à température ambiante. Le sang non utilisé après la réalisation des confettis et contenu dans le tube EDTA a été centrifugé à 2.000 tours/min pendant 10 min. Les différents constituants du sang total, c'est-à-dire plasma sanguin, *Buffy coat* et culot globulaire, ont été séparés puis conservés à - 80 °C.

2.2.1.2 - *Patients symptomatiques*

Les échantillons ont été collectés au jour d'inclusion. Seules les infections monospécifiques à *P. falciparum* confirmées par une goutte épaisse et un frottis sanguin positifs ont été analysées. La densité parasitaire devrait être comprise entre 2.000 et 200.000 parasites asexués/ μ L de sang, une température axillaire supérieure ou égale à 37,5 °C ou un antécédent de fièvre dans les 24 heures. L'obtention du consentement écrit des parents ou du représentant légal du participant, s'il a moins de 18 ans, avec la capacité de respecter les rendez-vous de suivi, ont été des préalables à l'inclusion. Au jour de la consultation médicale, après un diagnostic présomptif de paludisme posé par le médecin, le patient est conduit au laboratoire de la structure sanitaire pour



Figure 8. Confetti de papier filtre *Whatman 3 MM*.

- Note :**
- (1) Papier filtre *Whatman 3 MM*
 - (2) Spot de sang séché non encore découpé
 - (3) Identifiant de l'échantillon
 - (4 et 5) Empreintes laissées par les spots découpés
 - (6) Gel de silicate
 - (7) Sachet d'emballage

une confirmation à la microscopie. Une première lame de goutte épaisse et de frottis sanguin, ou GE/FS, y a été réalisée. Le protocole de l'étude est alors expliqué au patient par l'investigateur en cas de lecture positive à la microscopie indiquant la présence de parasites asexués de *P. falciparum* de densité parasitaire supérieure ou égale à 2000 trophozoïtes par microlitre de sang. En cas d'obtention du consentement écrit du participant, un prélèvement subséquent de sang veineux est effectué au pli du coude pour réaliser des tests sanguins supplémentaires. C'est alors que les confettis de l'étude sont confectionnés. Le papier filtre imbibé de sang a été séché à l'air ambiant.

2.2.1.3 - Conservation des échantillons

Chaque confetti a été étiqueté et placé dans un emballage de protection contenant du gel de silicate puis conservé au laboratoire à température ambiante dans des boîtes de conservation réservées à cet effet, à l'abri de l'humidité et de la chaleur jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique. Cette étape a été réalisée d'août à novembre 2008 dans le laboratoire de génétique du paludisme du département des sciences du génome à l'Université de Washington à Seattle, aux Etats-Unis d'Amérique.

2.2.2 - Découpage des spots de papier filtre et plans de microplaque

Les dimensions du confetti varient selon la méthode d'isolement de l'ADN plasmodial. Pour une extraction selon la procédure QIAamp® Mini kit, l'échantillon utilisé correspond à un disque d'environ 1 à 1,5 cm de diamètre représenté par un spot de sang sur du papier filtre *Whatman 3 MM*. Ce disque a été découpé en quatre parts à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince stérilisées à l'éthanol 70° après chaque usage. Les confettis obtenus ont été placés dans un tube stérile d'Eppendorf® 1,5 mL à l'aide de pinces. Le tube contenant le confetti a été ensuite étiqueté au code de l'échantillon correspondant. Le découpage a été réalisé dans une salle d'extraction d'ADN génomique de *P. falciparum*. Le découpage a été réalisé avec une paire de ciseaux stérilisée à l'éthanol 70° avant et après utilisation pour limiter les contaminations éventuelles.

Pour l'extraction selon la procédure *QIAamp® Investigator BioRobot®*, des morceaux rectangulaires voire oblongs de papier filtre *Whatman 3 MM* de 1 à 1,2 cm de long sur environ 0,2 à 0,3 cm de large ont été découpés dans le spot de sang. Les confettis obtenus ont été rangés dans des Bloc S selon le plan de plaque contenant les identifiants des échantillons collectés. Le plan de microplaque a été ensuite daté puis un code lui a été attribué. Les codes des plans de microplaques et les identifiants des échantillons ont permis d'assurer la traçabilité des échantillons au moment de l'analyse des données. Neuf plans de microplaque ont été réalisés (**Annexe 5**).

2.2.3 - Isolement de l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum*

2.2.3.1 - Procédure QIAamp® Mini kit

L'extraction a été réalisée à partir de la méthode QIAamp[®] Mini kit selon la procédure du fabricant. C'est une méthode d'extraction à quatre étapes. Mais elle a été adaptée comme décrite ci-après. Elle est rapide avec des produits ayant une bonne qualité. La qualité de l'ADN a été jugée par l'expérimentateur en comparant l'éclat des bandes des électrophorégrammes à celles du marqueur de poids moléculaire fourni par le fabricant. Cependant, l'ADN génomique d'un nombre maximum de 24 échantillons a pu être extrait par jour à cause des contraintes logistiques. La méthode d'extraction au Chelex a été aussi utilisée pour tenir compte du délai imparti pour le stage et pour des questions liées au budget.

Lyse

Les confettis sont placés dans un tube Eppendorf 1,5 mL auquel ont été ajoutés 180 µL de tampon de lyse ATL (*Tissue Lysis buffer*) et 20 µL de Protéinase K. Le tube a été homogénéisé au Vortex pendant quelques secondes puis a été incubé sur un bloc chauffant analogue de type Stuart SBH130 à 56 °C pendant une heure. Pendant l'incubation, le tube a été homogénéisé au Vortex toutes les 10 min. Le tube a ensuite été centrifugé brièvement afin de récupérer au fond du tube les gouttelettes formées par la vapeur dégagée lors du chauffage. Un volume de 200 µL du tampon AL (*Lysis buffer*) a été ajouté au tube puis le contenu a été homogénéisé manuellement par des chiquenaudes de quelques secondes. Le tube ainsi préparé a été incubé sur un autre block chauffant analogue de type Stuart SBH130 à 70 °C pendant 10 min avec une homogénéisation au vortex chaque 3 min. Cette phase s'est terminée par une seconde centrifugation brève dans le but de recueillir les gouttelettes de la face interne du couvercle du tube d'Eppendorf[®] formées lors du chauffage (**Figure 9**).

Adsorption

Le lysat contenu dans les tubes d'Eppendorf[®] a été transféré dans une colonne 'QIAamp[®] Mini Elude' puis centrifugé à 8 000 tours/min pendant une min. La membrane de la colonne QIAamp adsorbe de façon spécifique l'ADN du lysat et laisse passer les contaminants (**Figure 9**).

Lavages et élution

Les tampons de lavage AW1 (*Washing buffer 1*) puis AW2 (*Washing buffer 2*) ont été successivement ajoutés à la colonne QIAamp[®] Mini Elude, au volume de 500 µL l'un. Une centrifugation à 8.000 tours/min pendant une min a été réalisée après chaque ajout de tampon de lavage. Les inhibiteurs de la PCR comme les cations divalents et les protéines ont été totalement éliminés de la membrane de la colonne grâce aux tampons de lavage (**Figure 9**). Une dernière centrifugation a été réalisée à vitesse maximale, soit à 20.000 g ou 14.000 tours/min pendant 3min afin d'assurer l'élimination mécanique de tous les contaminants résiduels de la membrane de la colonne dans le but de purifier l'ADN.

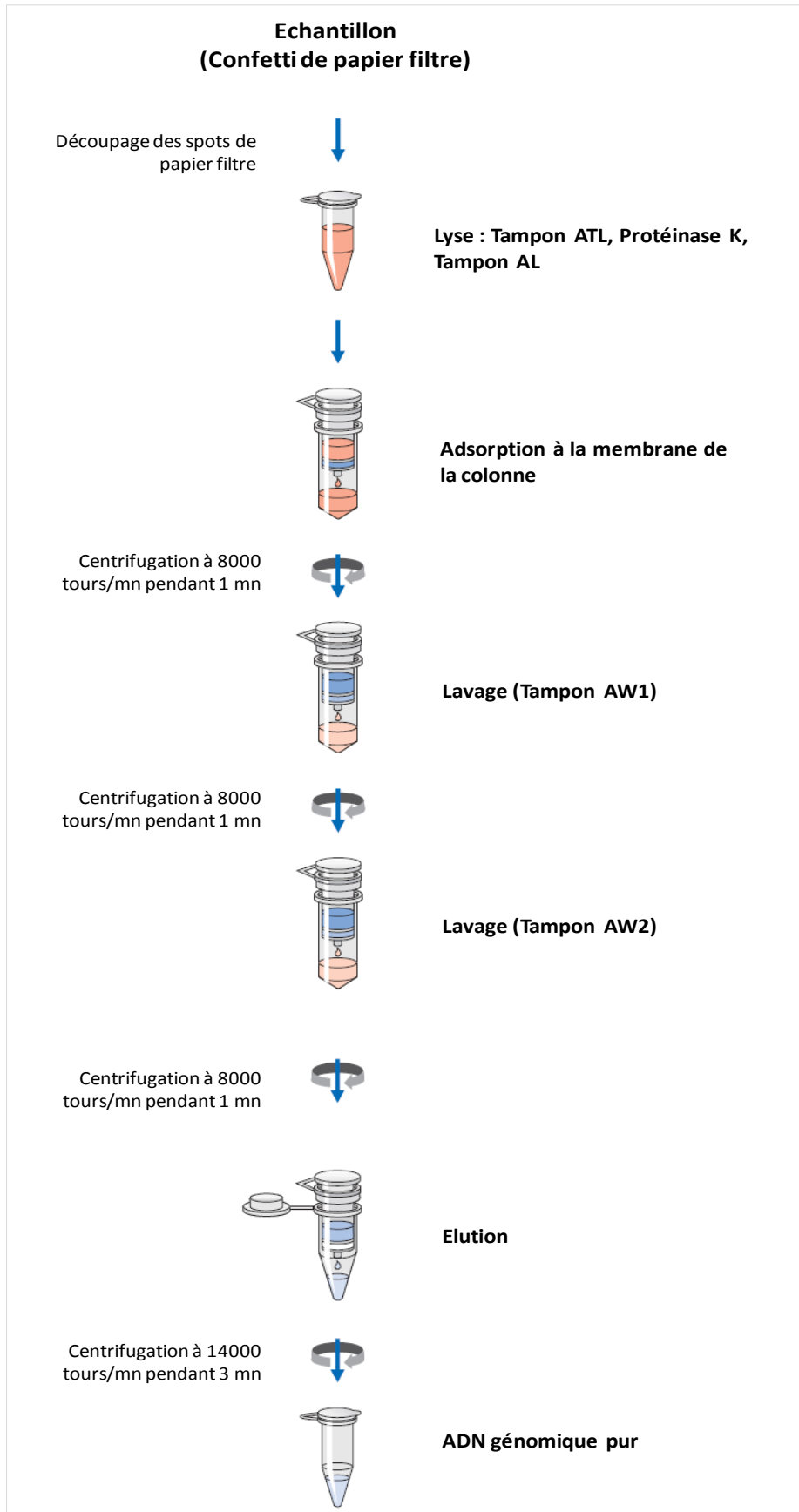


Figure 9. Procédure d'extraction QIAamp par centrifugations.

Note : Adapté de *QIAamp[®] DNA Mini and Blood kit Handbook, 3^{ème} édition, Avril 2010*

2.2.3.2 - Méthode du Chelex 100 (Bio-standards)

Les confettis ont été placés dans un block de stockage 96 puits de 1,2 mL de volume par puits ou block S contenant de la Saponine 0,5 % préparée avec du PBS 1X. L'ensemble a été incubé à 37 °C jusqu'au lendemain (*Overnight*). Cette étape de lyse a permis de rompre la membrane des globules rouges pour libérer l'hémoglobine dans la solution et laisser l'ADN génomique du parasite adsorbé au papier filtre. La saponine a été ensuite éliminée par lavage au PBS 1X avant l'ajout du mélange eau pure (100 µL) plus Chelex 20 % (50 µL). Le block S contenant le Chelex a été scellé à l'aide d'un microfilm adhésif en aluminium puis placé dans de l'eau bouillante pendant une vingtaine de minutes. Ainsi, le Chelex a adsorbé à son tour l'ADN puis s'en est détaché lorsque la température a baissé. Au fur et à mesure des centrifugations, le surnageant contenant l'ADN a été recueilli au détriment du Chelex et du papier filtre, composants essentiels des culots au fond des puits du block S.

2.2.3.3 - Procédure QIAamp® Investigator BioRobot®

L'ADN a été extrait à partir des confettis de papier filtre *Whatman 3 MM* par la procédure *QIAamp® Investigator BioRobot®* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Il s'agit d'un protocole commercial adapté à l'automate d'extraction *BioRobot Universal System* de Qiagen (**Annexe 6**). Ce protocole comporte deux étapes dont le prétraitement des confettis à la protéinase K et l'extraction proprement dite.

Digestion enzymatique à la Protéinase K

La protéinase K (EC 3.4.21.64) ou protéinase *Tritirachium* ou endopeptidase K est une sérine protéinase alcaline qui catalyse l'hydrolyse de la kératine et des protéines ayant une spécificité semblable à la subtilisine. Son rôle a été de :

- couper les liaisons peptidiques, de préférence, au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique ;
- digérer des protéines ou enlever les contaminants de préparations d'acides nucléiques ;
- inactiver les ADNases et ARNases.

La digestion enzymatique à la Protéinase K a été effectuée un jour avant la date prévue pour l'extraction. Elle a consisté à préparer un milieu réactionnel de digestion d'un volume de 200 µL composé d'un tampon de lyse ATL (180 µL/échantillon) et de la Protéinase K (20 µL/échantillon). Le milieu ainsi préparé a été homogénéisé lentement de sorte à éviter la formation d'écume savonneuse due au tampon ATL. C'est un détergeant qu'il a fallu éviter de faire mousser pour en faciliter la distribution dans les puits du Block S qui ont pu recueillir chacun un volume de 150 µL du milieu réactionnel de digestion. C'est le volume maximum toléré par le *BioRobot®*

Universal System. Le bloc de stockage a été agité au Vortex à 55 °C pendant toute la nuit (**Figure 10**).

Isolement, purification et conservation des extraits d'ADN

La **Figure 10** décrit les étapes de l'isolement et de purification de l'ADN génomique de *P. falciparum*. Sur un volume total de 150 µL d'éluât d'ADN pur obtenu à l'issue de l'extraction, 20 µL ont été conservés à 4 °C. C'est le volume de solution de travail à utiliser seulement pendant deux semaines pour garantir la qualité de l'extrait et des expérimentations. La solution mère d'éluât a été conservée à -80 °C. Pendant l'extraction, le logiciel QIAsoft 5.0, fourni avec le *BioRobot*, a été utilisé dans la procédure de purification d'ADN, assurant ainsi la répétabilité parfaite de cette activité.

2.2.4 - Séquençage conventionnel

2.2.4.1 - Amorces pour les amplifications par PCR

Les amorces de la nested-PCR ont servi pour la réaction de séquençage directe après marquage de l'amorce au fluorochrome ou BigDye®. Une seule amorce a été utilisée dans la composition du milieu réactionnel de séquençage au lieu d'un couple d'amorces comme dans la nested-PCR (**Tableau V**).

Le fragment d'intérêt a été ainsi séquencé dans le sens 5'-3' puis dans le sens 3'-5'. Les amorces ont été conçues par le laboratoire d'accueil et leur synthèse par Invitrogen™. La nested-PCR correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des amorces fraîchement préparées dont les séquences se situent à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR (Mullis *et al.*, 1986 ; Ntoumi *et al.*, 2001).

2.2.4.2 - Amplifications par PCR et électrophorèse

Réactions d'amplification

Les milieux réactionnels de l'amplification enzymatique ou « premix » ont été préparés dans une « salle propre » en utilisant des pointes à filtre ART® à barrière hydrophobe et des micropipettes. Les réactifs entrant dans la composition du premix et préalablement conservés à -20 °C ont été décongelés à température ambiante. Leur contenu a été homogénéisé vigoureusement au moyen d'un agitateur Vortex Top-Mix® I (Fisher Scientific). Chaque réactif a ensuite été placé dans des paillettes de glace de 0 °C contenues dans un récipient.

Les volumes du premix correspondant au nombre total de réactions d'amplification ont été préparés en tenant compte des volumes de chaque réactif (**Annexe 2**). Les volumes de réactifs composant le premix ont ensuite été recueillis dans un microtube stérile Eppendorf® de 1,5 mL placé aussi dans les paillettes de glace. Un volume supplémentaire de réactant a été ajouté pour

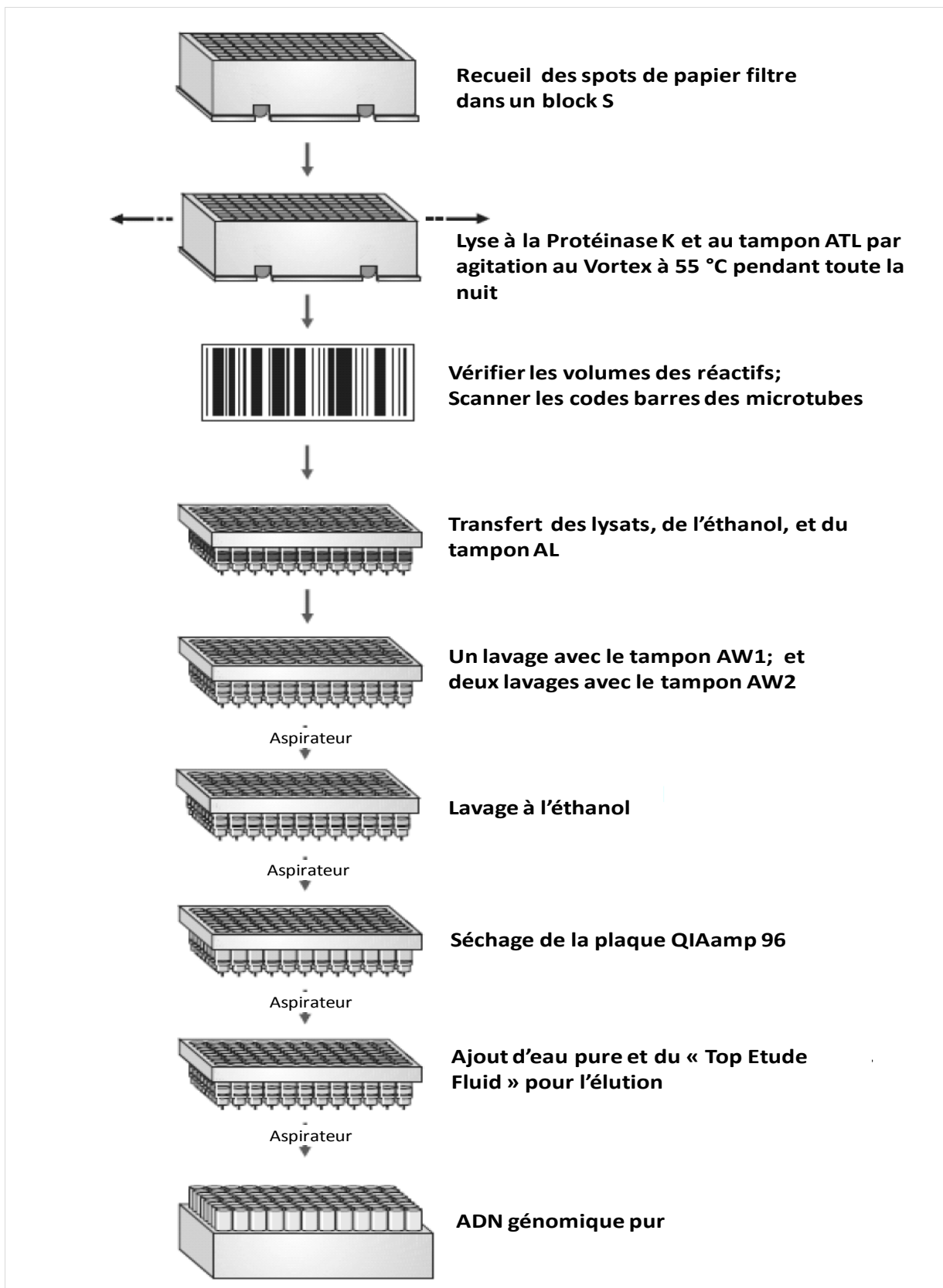


Figure 10. Etapes pour l'extraction de l'ADN génomique au *BioRobot*
 Adapté de *QIAamp® Investigator BioRobot® kit Handbook* (Septembre 2008, p. 9).

Tableau V. Séquences des amorces utilisées au cours de la PCR et du séquençage de l'ADN extrait d'isolat issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008.

Gènes	Tour	Amorces	Séquences (5'-3')	Taille (pb)
Réactions PCR				
<i>pf dhfr</i>	Primaire	S217 (Sens)	CTC CTT TTT ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT TTC G	36
		S218 (Reverse)	TCA TAT GAC ATG TAT CTT TGT CAT CAT TCT TTA AAG GC	38
	nested	S1226 (Sens)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
		S1227 (Reverse)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pf dhps</i>	Primaire	S219 (Sens)	GTC TGC GAC GTT TTC GAT ATT TAT GCC	27
		S229 (Reverse)	GGC ATA TCA TTA TTT TTT TCT TCT CCT TTT ATA C	34
	nested	S1224 (Sens)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
		S1225 (Reverse)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21
<i>pf crt</i>	Primaire uniquement	S1236 (Sens)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	20
		S1237 (Reverse)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	23
Réactions de séquençage				
<i>pf dhfr</i>		S1226 (Sens)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
		S1227 (Reverse)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pf dhps</i>		S1224 (Sens)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
		S1225 (Reverse)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21
<i>pf crt</i>		S1236 (Sens)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	20
		S1237 (Reverse)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	23

compenser les pertes causées par le pipetage. Le premix contient du *FailSafeTM PCR Enzyme Mix*. C'est un mélange d'enzymes qui procure une fidélité de lecture plus haute que celle de la Taq DNA Polymérase utilisée seule. Il est fourni dans une solution de glycérol 50 % contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween[®] 20, 0,5 % NP-40, 1 mM dithiothreitol. Ce mélange contient un enzyme de détection et de correction des erreurs de lecture dans le sens 3' vers 5'. Pour cette raison, il est d'utilisation appropriée si le séquençage suit l'amplification (**Annexe 2**).

Dix-huit microlitres du premix ont été mis dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits contenant au préalable 2 µl d'extrait d'ADN génomique. La microplaque contenant le premix et l'ADN génomique a été recouverte d'une feuille adhésive *EasySeal* puis placée dans un thermocycleur de type *MJ ResearchTetrad PTC-225* (BioRad). Les programmes d'amplification primaire « MARNIE », « PFDHPS » et « PFCRT » correspondant au gène *pfdhfr* et *pfdhps* ont été utilisés, respectivement (**Annexe 3**). Pour la PCR-nichée, 19,5 µl de premix ont été recueillis dans chaque puits d'une autre microplaque PCR de 96 puits contenant au préalable 0,5 µl de produits de la première amplification ou PCR primaire. Ce second milieu réactionnel a été aussi amplifié au thermocycleur (*MJ ResearchTetrad PTC-225, BioRad*) selon les programmes « MARNIE » et « PFDHPS » correspondant au gène *pfdhfr* et *pfdhps*, respectivement (**Annexe 3**).

La PCR-nichée ou Nested-PCR est une amplification en deux étapes successives, avec deux couples différents d'amorces, le premier couple étant conçu pour pouvoir accrocher des régions conservées du génome, le deuxième pour identifier le sous-type en liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon.

Électrophorèse

Une électrophorèse a été réalisée avec un gel à 1 % d'agarose pure (Seaken[®] LE Agarose, Cambrex Biosciences Rockland, Inc.) en pesant 0,60 mg de poudre d'agarose pure recueilli dans un Erlenmeyer puis en ajoutant 60 mL de tampon Tris-Borate-EDTA 1X (1 M Tris-HCl ; 0,8 M acide borique ; 2 mM EDTA ; pH 8,0). L'ensemble a été brièvement homogénéisé de façon manuelle puis l'Erlenmeyer a été placé au four à micro-ondes pendant deux min. Un barreau aimanté a été placé dans l'Erlenmeyer contenant le gel et le tampon. L'ensemble a été homogénéisé au moyen d'un agitateur magnétique non chauffant (Fisher Scientific). Une fois que le gel obtenu a tiédi à température ambiante, il est coulé délicatement dans un moule portant un peigne, de sorte à éviter la formation de bulles capables de compromettre la migration des fragments d'ADN. Une fois solidifié, le peigne a été débarrassé soigneusement du gel qui a alors libéré des puits. L'ensemble gel et moule a été placé dans la cuve de migration contenant du tampon de migration TBE 1X. Un volume de cinq µL de produit d'amplification et un µL de

tampon de charge Gel Loading Dye Blue 6X (BioLabs) ont été ensuite placés dans des puits prévus à cet effet. Le marqueur de poids moléculaire SmartLadder 200 - 10.000 pb (Eurogentec, CA, USA), le témoin négatif composé essentiellement du premix et un contrôle positif ont été mis dans leur puits respectifs. Le gel a été disposé dans la cuve de migration pour une électrophorèse à 135 volts pendant 20 min. À la fin de l'électrophorèse, le gel d'agarose a été plongé dans une solution de Bromure d'Ethidium pendant 5 à 10 min. Il a été rincé avant d'être déposé sur une table à UV disposée dans une chambre noire miniaturisée de type G : BOX BioImaging Systems (Syngene Inc.), comme l'indique l'**annexe 4**.

La solution du tampon de charge *Gel loading dye blue (6X)* contient 2,5 % de Ficoll 400, 11 mM EDTA, Tris-HCl 3,3 mM, SDS 0,017 %, Bleu de bromophenol 0,015 %, pH 8,0 à 25 °C. Le Bleu de bromophenol est le colorant standard de traçabilité utilisé au cours de l'électrophorèse. Il migre à environ 300 pb sur un gel d'agarose standard à 1 % de TBE. Cette solution contient du Sodium Dodécyl Sulfate ou SDS qui permet d'obtenir des bandes plus nettes en débarrassant l'ADN d'enzymes résiduels éventuels. Elle contient aussi de l'EDTA qui sert de chélateur du magnésium utilisé au cours des réactions enzymatiques. La quantité d'ADN s'obtient en comparant l'éclat de la bande à celles du standard de poids moléculaire. Pour un individu donné, lorsque la taille de la bande correspond à la taille du fragment de gène recherché et si l'éclat de la bande indique une quantité supérieure ou égale à 40 ng d'ADN, alors l'amplicon contenant l'ADN est acceptable pour être séquençé. Une quantité d'ADN de 15 à 100 ng a été estimée par bande correspondante avec le standard SmartLadder SF.

2.2.4.3 - Amplification de séquençage

Milieu réactionnel et programmes d'amplification de séquençage

Deux milieux réactionnels, à raison d'un par amorce de PCR-nichée, ont été préparés à partir des produits d'amplification afin de réaliser un séquençage dans les deux sens du fragment obtenu. Un volume de 10 µL de milieu réactionnel (**Annexe 2**) a été amplifié selon le programme SEQ du thermocycleur (**Annexe 3**).

Purification à l'éthanol

Après la réaction d'amplification de séquençage (**Annexe 3**), 26 µL d'éthanol 95 % ont été ajoutés à chaque puits de la microplaque PCR contenant les séquences nouvellement générées. La plaque recouverte d'un film adhésif en aluminium (Microseal[®]) a été incubée à 20 °C pendant 15 min et centrifugée à 3000 g pendant 30 min. Après ce délai, le film adhésif a été enlevé et la plaque placée à l'envers sur du papier buvard pour se débarrasser de tout l'éthanol 95%. Maintenu dans cette position, la plaque a été centrifugée à 700 g pendant 1 min pour s'assurer d'avoir totalement enlevé l'alcool. Un volume de 125 µL d'éthanol 70 % a été encore ajouté dans chaque

puits de la même plaque et une nouvelle centrifugation a été réalisée à 3000 g pendant 10min. Après avoir éliminé tout l'alcool selon le procédé décrit plus haut, la plaque a été mise à sécher à température ambiante pendant 15 à 20 min. Elle a ensuite été recouverte avec un film aluminium adhésif puis conservée à - 20 °C jusqu'à la lecture des profils bruts ou 'base-calling' par l'automate à électrophorèse capillaires AB3100 (*Applied Biosystems*). Un volume 26 µL d'eau pure a été ajouté à chaque puits de la microplaque juste avant le séquençage automatique.

2.2.4.4 - Détermination de la séquence par appel de bases

La détermination de la séquence par appel de bases, ou *base-calling* a été effectuée à l'aide de programmes automatiques qui ont lu les bases nucléotidiques, comparé les séquences similaires et fourni une plate-forme intuitive de correction. Les programmes automatisés comme le programme public Phred développé à l'Université de Washington ont converti les fichiers traces en séquences que l'on a pu entrer dans une base de données juste après le séquençage. Cette information a été utilisée lors des étapes ultérieures de comparaison de séquences (Ewing *et al.*, 1998 ; Ewing et Green, 1998).

2.2.4.5 - Après la réaction de séquençage

Edition des contigs

L'étape de finition lors du séquençage d'un morceau d'ADN, ou contig, comprend l'alignement, le repérage et la correction des erreurs. Cette étape a été réalisée avec le logiciel d'édition de séquences Sequencher 4.1.4 (Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Les contigs ou fragments brutes issus de l'automate, sont des séquences d'ADN assemblées en fusionnant deux séquences d'ADN ou d'avantage. Dans le cas de ce travail, il s'agit des séquences 'brutes' correspondant aux gènes *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf crt* des isolats collectés. À l'aide de Sequencher 4.1.4, les séquences issues d'isolats correspondant à une même microplaque ont été corrigées une à une puis analysées en parallèles pour la recherche de mutations éventuelles : c'est l'alignement.

Alignement

Il consiste à aligner en parallèle deux séquences d'ADN, voire d'avantage, en maximisant le nombre de nucléotides ou de résidus identiques, tout en minimisant le nombre de mésappariement et de vides. Tous les contigs sont alignés y compris les séquences de référence des gènes correspondant disponible en ligne dans de la banque de données publique GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Repérage

Il a consisté à détecter les loci d'intérêt, à savoir les codons en position 16, 51, 59, 108, 164 du polypeptide PfDHFR, ou les bases nucléotidiques en position 48, 153, 177, 324, 492 de la

séquence nucléotidique du gène *pfdhfr*. Les codons en position 436, 437, 540, 581 et 614 de la protéine PfDHPS, ou les nucléotides en position 1308, 1311, 1620, 1743 et 1842 du gène *pfdhps* ont aussi été analysés. De même que les codons 72, 73, 74, 75, 76 du polypeptide PfCRT ou les nucléotides en position 216, 219, 222, 225, 228 du gène *pfCRT*.

L'édition de séquences des isolats a été réalisée en comparant, pour un gène donné, tous les contigs en parallèle avec une séquence de référence correspondant à la souche de référence 3D7 de la banque de données publique GenBank. Les polymorphismes uniques de nucléotides ou SNP ont été ainsi détectés dans les fragments de gènes séquencés.

Détermination des haplotypes

Le séquençage direct a permis de voir, au moyen du logiciel Sequencher 4.1.4, la combinaison des mutations individuelles, ou haplotypes correspondant à un individu. Lorsqu'aucune mutation ou une mutation unique apparaît à un locus donné, les allèles sont attribués plus facilement. C'est le cas des mutants purs. Dans le cas où plus d'un locus a une infection mixte, il a n'été pas été possible de déterminer le génotype de l'isolat avec exactitude. Par ailleurs, lorsque le signal indique une infection mixte à un locus donné, les pics supplémentaires n'ont été pris en compte dans l'analyse moléculaire que si la hauteur de leurs pics respectifs est au moins égale au tiers, c'est-à-dire 33 %, de la hauteur du pic majeur.

2.2.5 - Pyroséquençage

2.2.5.1 - Gènes étudiés et amorces utilisées pour le pyroséquençage

Trois séquences des gènes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfCRT* ont été étudiées dans le cadre de cette étude. Elles ont été décrites dans le premier chapitre du présent document. Les amorces utilisées pour les amplifications par PCR simple et par nested-PCR ont permis d'obtenir les produits d'amplification ou amplicons à pyroséquencer (**Tableau VI**). Des amorces de pyroséquençage, longues d'une vingtaine de paires de bases et ne se fixant qu'en amont du locus d'intérêt, ont été utilisées pour le pyroséquençage (**Tableau VII**). Les amorces ont été conçues et validées au laboratoire d'accueil. Toutes les amorces utilisées pour le pyroséquençage ont été préalablement optimisées par des tests de gradient de température avec l'ADN des isolats de terrain et des isolats de référence comme 3D7, HB3, FC27, V1S, PS-Mali, K1, FR50, 7G8, DD2. Les isolats de référence ont été fournis par le *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center/American Type Culture Collection* (MR4/ATCC, Manassas, Vermont, USA). Les mutations portées par ces isolats sont indiquées au **tableau VIII**.

2.2.5.2 - Amplifications et électrophorèse

Composition des milieux réactionnels d'amplification

Tableau VI. Amorces utilisées pour les amplifications primaires par PCR et secondaires par nested-PCR.

Gènes	Codons	Amorces	Séquences (5' - 3')	Bases	Taille des amplicons (pb)
<i>pfdhfr</i>	50/51/59	50/51/59 EF	TGA TGG AAC AAG TCT GCG AC	20	322
		50/51/59 ER	CTT GTT CTT CCC ATA ACT ACA	21	
	108/164	sec 1F	GCGACGTTTTTCGATATTTATGC	22	262
		sec 1R	B -GGCATATCATTACATTATCCACAGTTT	28	
		108/164 EF	AGA AAC TGT GGA TAA TGT AAA TGA TAT G	28	369
		108/164 ER	TGA TAC TCA TTT TCA TTT ATT TCT G	25	
sec 2F	B -CTAATTCTAAAAAATTACAAAATGT	25	303		
	sec 2R	CACATTCATATGTACTATTT		20	
<i>pfdhps</i>	436/437	436/437 EF	TAT TAA ATG TTA ATT ATG ATT CT	23	249
		436/437 ER	GTT TCG CAT CAC ATT TAA CAA TT	23	
	sec 3F	B -TGTTCAAAGAATGTTTTGAATGA	23	148	
		sec 3R	CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT		25
	540/581	540/581 EF	TGCTTGTACAAATAATCCAGAAAT	24	300
		540/581 ER	CCAATAAAAAGTGGATACTCATCA	24	
sec 4F	GTTCTAATGCATAAAAGAGG	20	195		
	sec 4R	B -TAAGAGTTTAATAGATTGATCATGTTTCTTC		31	
<i>pfprt</i>	72 - 97	72-97EF	GAC CTT AAC AGA TGG CTC AC	20	
		72-97ER	TTT TAT ATT GGT AGG TGG AAT AG	23	
	sec IF	B -GGT AAA TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT ATT	30	250	
	Sec IR	TTA CTT TTG AAT TTC CCT TTT TAT TTC CA	29		

Note : 'E' : couples d'amorces 'Externe' et 'sec', amorces internes de la nested-PCR. F : brin sens 5'-3' et R, brin antisens 3'-5'. B : résidu biotinylé.

Tableau VII. Amorces de pyroséquençage

Gène	Codon	Amorce	Séquence analysée (5' - 3')	Bases	Ordre de dispensation (Pyroséquenceur)
<i>pdfhfr</i>	50/51	50/51F	GGTCTAGGAAATAAAGGAGT	20	ES GAT ACA TGA TCA GTA TGC
	59	59F	CCCTAGATATGAAATATTTT	20	ES ATC AGT GCA GTA C
	108	108R	TGGAATGCTTTCCAG	16	ES AGC TCG TC
<i>pdfhps</i>	436/437	436/437R	GGATTAGGTATAACAAAAGG	20	ES TAG CTA GAC TGA
	540	540R	ATCCACATACAATGGAT	17	ES TAG AGC TAC A
<i>pfprt</i>	72-76	72-76R	AGTTCTTTTAGCAAAAATT	19	ES CGT ATC ATA GCA CAT GAC

Tableau VIII. Variations de simple base au sein de séquences codantes d'acides aminés.

Gènes	Position du SNP	Séquence Sauvage	Acide aminé correspondant	Séquence mutée	Acide aminé correspondant	Souches témoins (souches de référence)			
						Sensibles		Mutantes	
<i>pfdhfr</i>	50	TGT	Cys	<u>C</u> GT	Arg	HB3		FR-50	
	51	AAT	Asn	A <u>T</u>	Ile	HB3		V1S	
	59	TGT	Cys	<u>C</u> GT	Arg	HB3		V1S	
	108	AGC	Ser	A <u>A</u> C/ <u>A</u> CC	Asn/Thr	FR-50		V1S	
<i>pfdhps</i>	436	TCT	Ser	<u>G</u> CT	Ala	PS-Peru		PS-Mali	
	437	GCT	Ala	<u>G</u> G <u>T</u>	Gly	PS-Mali		PS-Peru	
	540	AAA	Lys	<u>G</u> AA	Glu	PS-Mali		PS-Peru	
<i>pfprt</i>	72	TGT	Cys	<u>A</u> GT	Ser	3D7	DD2	7G8	
	74	ATG	Met	A <u>T</u>	Ile	3D7	7G8	DD2	
	75	AAT	Asn	<u>G</u> AA	Glu	3D7	7G8	DD2	
	76	AAA	Lys	A <u>C</u> A	Thr	3D7	HB3	DD2	7G8

Note : En gras, le locus d'intérêt ou codon cible. En noir, le nucléotide sensible correspondant à l'allèle sauvage. En bleu et souligné, le nucléotide correspondant à l'allèle mutant

Une double amplification suivie d'une électrophorèse a précédé la réaction de pyroséquençage. Les microplaques contenant les extraits d'ADN génomique et initialement conservées à + 4 °C ont été décongelées et centrifugées à 1.500 tours/min pendant 5 min. Le contenu du microtube a été sédimenté. Un volume aliquote de 1 µL d'extrait d'ADN a été mis dans chaque puits de la microplaque contenant au préalable 24 µL de milieu réactionnel (**Annexe 7**).

Les séquences du couple d'amorces externes utilisées pour les amplifications primaires des gènes *pfdhfr* et *pfdhps* et *pfprt* sont présentées au **tableau VI**. La microplaque contenant le premix, ou microplaque PCR1, a ensuite été thermoscellée avec une feuille adhésive *ABgene* grâce à une thermosoudeuse manuelle sur statif de type ALPS 25 (Thermo Scientific). La microplaque PCR 1 a été brièvement agitée au Vortex (Top-Mix[®] Evolution, Fisher Scientific) pour en homogénéiser le contenu. Puis elle a été centrifugée à 2000 tours/min (Fisher Thermo Scientific) pendant quelques secondes avant d'être portée au thermocycleur (Dyad & Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler, Biorad) pour l'amplification primaire en suivant le programme du gène considéré (**Annexe 8**). Un second milieu réactionnel a été préparé dans un volume de 24 µL avec les couples d'amorces internes Sec XF et Sec XR, ou IF et IR selon le gène à analyser. Un µL de produit de la PCR2 a été ajouté au milieu. La composition des milieux réactionnels d'amplification primaire et secondaire pour les fragments correspondant aux gènes *pfdhfr* et *pfdhps* ne diffèrent que par les couples d'amorces utilisées (**Annexe 7**). La microplaque PCR 2 contenant le milieu réactionnel de la PCR 2 a subi le même traitement que la microplaque PCR1 avant d'être portée au thermocycleur (Dyad & Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler, BIORAD) pour la nested-PCR selon le programme du gène à analyser (**Annexe 8**).

Électrophorèse

Une migration par électrophorèse a été réalisée à partir des produits de la nested-PCR pour une appréciation visuelle de la qualité et de la quantité de l'ADN amplifié. L'automate QIAxel (Qiagen) qui a été utilisé à cet effet se sert d'un marqueur d'alignement pour aligner les bandes de chacune des 12 colonnes de la microplaque sur une échelle interne de poids moléculaire. Un volume de 15 µl d'un marqueur d'alignement (*QIAxel DNA Alignment marker 15bp/1Kb*, Qiagen) a été placée dans les 12 microtubes d'une barrette de microtube (*QIAxel Colored 0.2 mL 12 - Tube Strip*, Qiagen). Le marqueur de poids moléculaire de 50-800 pb (*QIAxel DNA Size Marker 50-800 bp*, Qiagen) lui a servi à déterminer la taille des bandes révélées. Avant de démarrer l'électrophorèse, la microplaque PCR 2 a été disposée dans le chariot de l'automate QIAxel (Qiagen) parallèlement à la barrette de microtubes. Toutes les bandes relatives à la microplaque PCR 2 ont été révélées, analysées et déterminées grâce au logiciel Biocalculator (**Figure 11**).

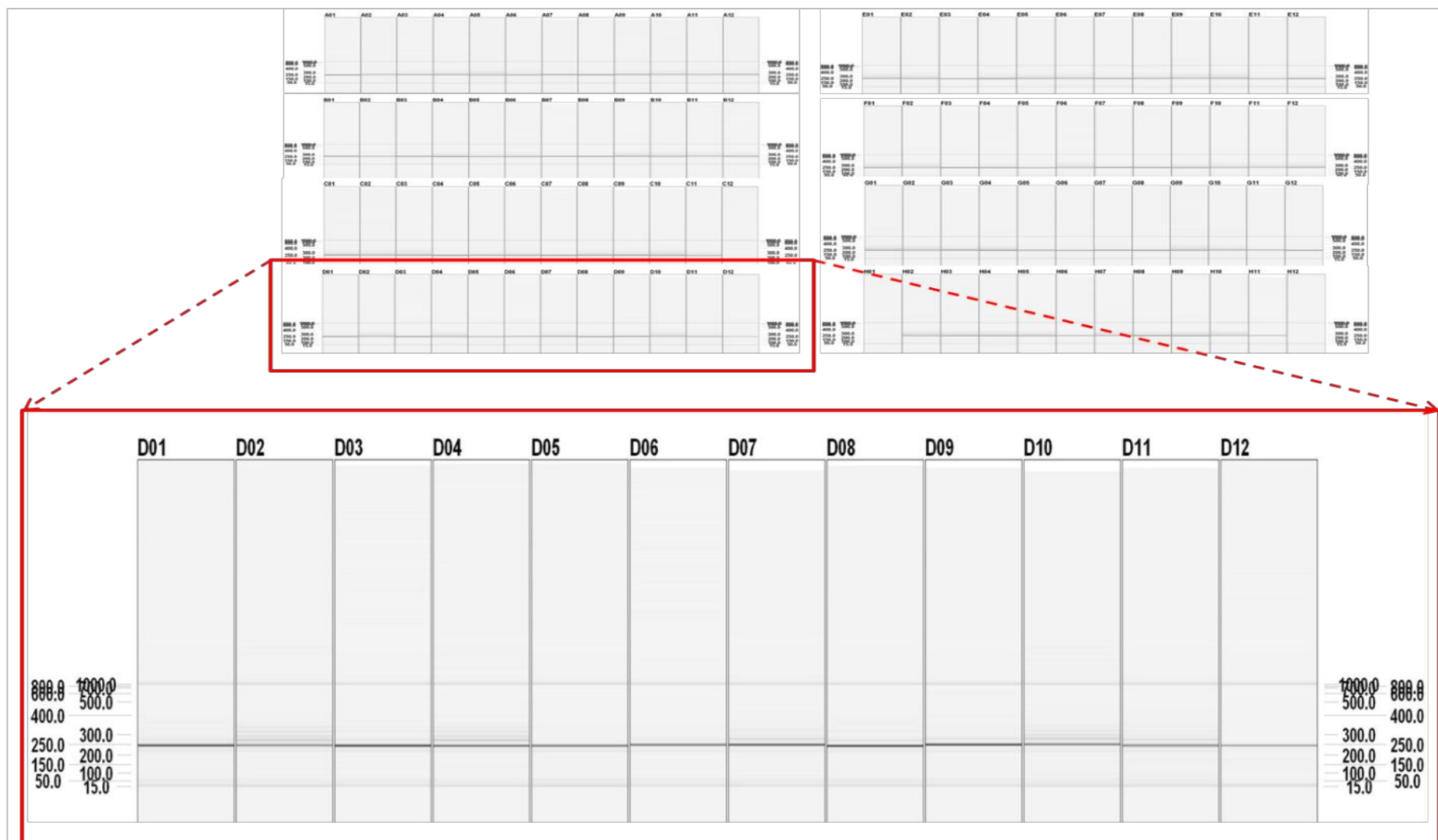


Figure 11. Électrophorégramme de la microplaque n°1 pour le gène *pfcrt* réalisé avec l'automate QIAxel (Qiagen, Valencia, CA).

Note : L'intensité des bandes varie en fonction de la quantité d'ADN génomique contenue dans le produit PCR2 biotinyllé.

2.2.5.3 - Technique du pyroséquençage proprement dite

2.2.5.3.1 - Étapes pré-analytiques

Milieu réactionnel pour la réaction de liaison

La réaction de liaison a consisté à immobiliser les produits biotinylés de la nested-PCR sur des microbilles magnétisées recouvertes de Streptavidine-Sepharose™ à haute performance (Amersham Biosciences, Piscataway NJ). Un résidu biotinylé a été fixé à l'extrémité 5' d'une des deux amorces de nested-PCR (**Tableau VI**).

Un volume de 70 µL de milieu réactionnel a été recueilli par puits de la microplaque 1. Ce volume correspondant au milieu réactionnel de la réaction de liaison a comporté 40 µL de tampon de liaison fourni par la firme Biotage AB (Tris-HCl 10 mM ; pH 7,6 ; NaCl 2 M ; EDTA 1 mM ; Tween 20 à 0,1 %), de 28 µL d'eau pure et de 2 µL de microbilles de Streptavidine-Sepharose™ (Amersham Biosciences, Piscataway NJ). Quelques microlitres supplémentaires ont été ajoutés au volume correspondant au nombre total d'échantillons à analyser pour compenser les pertes éventuelles dues au pipetage. Le volume de produit de nested-PCR à ajouter au contenu de chaque puits de la microplaque 1 a été déterminé en fonction de l'intensité de la bande correspondante obtenue à l'électrophorèse. Pour une bande intense à l'électrophorégramme correspondant à une quantité importante d'ADN dans les amplicons de la nested-PCR, un à cinq µL de produit de la nested-PCR ont été ajoutés au milieu réactionnel pour y fixer les microbilles magnétisées de streptavidine. Au contraire, pour une bande moins intense ou plus claire correspondant à une faible quantité d'ADN dans les amplicons de la nested-PCR, 5 à 15 µL de produit de cette nested-PCR ont été utilisés. Ainsi, la microplaque 1 contenant les volumes adéquats d'amplicons de nested-PCR et de milieu réactionnel de liaison a été recouverte d'un film adhésif transparent avant d'être vigoureusement agitée horizontalement au *Thermomixer R* d'Eppendorf à 1 400 tours/min pendant environ 5 min à température ambiante.

Milieu réactionnel pour la réaction d'hybridation

Les produits biotinylés de la PCR secondaire liés aux microbilles magnétisées de streptavidine et contenus dans la microplaque 1 ont été capturés, par aspiration, par des sondes ancrées au filtre de l'aspirateur de la station de travail du Pyroséquenceur (*Pyrosequencing Vacuum Prep Tool*, Biotage AB). Ensuite, les fragments d'ADN biotinylés ont été purifiés à l'éthanol 70 %, dénaturés avec un tampon de dénaturation à base de soude (NaOH 0,2 M), puis lavés avec du tampon de lavage 1 X (Tris-acétate 10 mM, pH 7,6 ; Biotage AB), successivement. Pour ce faire, le filtre portant les fragments d'ADN biotinylés a été trempé successivement dans trois des quatre auges de la plateforme de travail où ont été disposés les réactifs ci-dessus (**Annexes 9** et

10). Chacune de ces opérations a duré 15 secondes. Les produits d'amplification devenus monocaténares sous l'effet de la soude et débarrassés de leur brin complémentaire après lavage au tampon 1X ont été mis à sécher à température ambiante en tenant le filtre hors des auges pendant 15 secondes. Une pompe à vide à laquelle est relié l'aspirateur a été maintenue active pendant les 60 premières secondes de l'expérimentation. Elle a été désactivée à l'issue de cette période. Un volume de 0,05 µL d'amorces de pyroséquençage 100 µM (**Tableau VII**) a été ajouté au milieu réactionnel d'hybridation composé d'un volume de 11,95 µL du tampon d'hybridation (Tris-Acétate 20 mM, (CH₃COO)₂ Mg 2 mM, pH 7,6) fourni par Biotage AB. Ce volume de milieu réactionnel d'hybridation a servi à hybrider les amorces de pyroséquençage aux brins monocaténares d'ADN biotinylés de la microplaque 1. La seconde période de l'expérimentation a consisté à emboîter les dents du filtre aux puits de la microplaque 2 ou microplaque de pyroséquençage (PSQTM HS 96-puits, Biotage AB) disposée au préalable sur la station de travail. Dans cette position, le filtre a été vigoureusement agité à la main pendant 1 à 2 min afin de transférer les amplicons monocaténares biotinylés au milieu d'hybridation de la microplaque 2. A la fin du transfert, la microplaque 2 a été recouverte d'un film adhésif transparent avant d'être immédiatement portée au bloc chauffant à 80 °C pendant 2 min et refroidie à température ambiante. Cela favorise l'hybridation des brins monocaténares biotinylés aux amorces de pyroséquençage. Après le transfert, l'aspirateur portant le filtre du Pyroséquenceur est mis dans la quatrième auge de la station de travail contenant de l'eau MiliQ ultra pure.

2.2.5.3.2 - Réaction de pyroséquençage

Pour la réaction de pyroséquençage, la microplaque 2 est mise dans la chambre du Pyroséquenceur PSQTM HS 96A (**Annexe 9**) en même temps que les milieux réactionnels d'enzymes E, substrat S, de nucléotides ([Ronaghi M, 2002](#)). Un ordre prédéfini d'addition des nucléotides sert à déterminer la séquence du brin biotinylé à analyser et auquel l'amorce de pyroséquençage a été hybridée. Le milieu réactionnel d'enzymes E est composé de 5 U/µl du fragment de Klenow d'ADN polymérase, 40 mU/µl d'Apyrase, 500 ng de Luciférase purifiée, 15 mU/µl d'ATP Sulfurylase recombinée. Celui du substrat S est constitué de 5 mM d'acétate de magnésium, 0,1 % de sérum albumine bovine, 1 mM de dithiothreitol (DTT), 5 µM d'Adénosine-5-phosphosulfate (APS), 0,4 mg/ml de Polyvinyl pyrrolidone (360.000) et 100 µg/ml de D-Luciférine. Les deux milieux ont été dilués par l'ajout de 620 µl d'eau pure avant usage, selon les instructions du fabricant. Les bases nucléotidiques Adénine, Cytosine, Guanine, et Thymines ont été fournies séparément sous la forme de 20 µl de dinucléotides triphosphates ou dNTP. Il s'agit des bases dATP-αS 0,1 M, dCTP, dGTP et dTTP, livrées après

un traitement avec 1 µl de Pyrophosphate inorganique (PPi) 100 mM. Le PPi a pour rôle de supprimer les signaux non spécifiques générés par du PPi souillé (Ronaghi M, 2002). Les volumes exacts d'enzymes E, de substrat S et des quatre nucléotides à prélever ont été déterminés grâce au logiciel Pyromark 2.0. Les volumes varient en fonction du nombre d'échantillons et des onze loci SNP à analyser (**Tableaux VIII et IX**).

2.2.5.3.3 - Validation des données brutes

Le logiciel Pyromark 2.0 a utilisé un code de 3 couleurs (Bleue : bon ; orange : à revérifier ; rouge : mauvais) pour apprécier la qualité des résultats du pyroséquençage. Pour valider ces résultats bruts deux paramètres additionnels ont été considérés : la forme de la courbe-signal correspondant au nucléotide pyroséquéncé et sa taille. La courbe correspondant au nucléotide ciblé devait être de forme très effilée et en pointe pour que le résultat soit considéré comme valide. De même la taille du signal devait égaler 100 % de la moyenne des signaux du pyrogramme. Une courbe moins effilée ou un signal de taille inférieure à 100 % de la moyenne correspondait à un excès de produit de nested-PCR dans le milieu réactionnel de fixation. Dans ce cas, l'expérimentation a été répétée avec un volume adéquat de produit d'amplification de l'échantillon concerné jusqu'à obtention d'une forme acceptable du signal (**Annexe 11**). Les pyrogrammes ont été analysés indépendamment par deux expérimentateurs.

2.2.5.3.4 - Analyses des données brutes issus du Pyroséquenceur

Les résultats bruts ont pu être générés par le logiciel Pyromark (Biotage AB) selon deux modes : l'un quantitatif ou '*Allele Quantitation mode*', utilisé pour les gènes *pf dhfr* et *pf dhps*, l'autre qualitatif ou '*SNP mode*' utilisé pour *pf crt*.

Le mode AQ correspond à la quantification des allèles. Sous ce mode le score (en pourcentage) à attribuer à un allèle donné correspond à la probabilité de présence de cet allèle au locus analysé, soit ici l'allèle muté. Au locus Cys-59-Arg du gène *pf dhfr* par exemple où la Cys est représentée par le codon TGT et l'Arg par le codon CGT, l'apparition de la thymine (T) sur le pyrogramme indique que l'isolat analysé pourrait porter l'allèle sensible Cys-59. Au contraire l'apparition de la cytosine (C) indique que l'isolat analysé pourrait plutôt porter l'allèle muté Arg-59.

Pour le gène *pf dhps* dont les amorces ont porté la mention R ou antisens 3'-5', il a fallu faire une lecture contraire. Ainsi, la position 1 du pyrogramme correspondait au locus Ala-437-Gly et la position 2 au locus Ser-436-Ala. Ici, l'apparition de la guanine (G) sur le pyrogramme signifie l'existence de la Cytosine (C) du codon Alanine (GCT) au niveau du locus analysé. De même si la cytosine (C) apparaît sur le pyrogramme à cette position, cela signifie alors l'existence de la guanine (G) du codon glycine (GGT) au locus correspondant. Ce principe vaut pour la position

Tableau IX. Volumes respectifs d'enzyme, de substrat et de nucléotides nécessaires pour la réaction de pyroséquençage pour 100 échantillons.

Gènes	<i>pfdhfr</i>			<i>pfdhps</i>		<i>pfprt</i>
	50/51 F	59 F	108 R	436/437 R	540 R	72 - 76 R
Enzyme (volumes)	182	182	182	182	182	182
Substrat (volumes)	182	182	182	182	182	182
Adénine (volumes)	64	53	53	36	53	64
Cytosine (volumes)	47	47	42	47	42	64
Guanine (volumes)	53	47	47	42	42	47
Thymine (volumes)	58	47	47	42	42	53

Note : Les lettres F et R indiquent le sens de lecture de l'amorce, soit Sens ou 5'-3' (c'est-à-dire F pour *Forward*) ou Antisens ou 3'-5' (c'est-à-dire R pour *Reverse*).

2. Si une alanine (A) apparaît sur le pyrogramme à cette position, cela signifie l'existence de la thymine (T) du codon serine (TCT) au locus correspondant. Si c'est plutôt la cytosine (C) qui apparaît, alors c'est la guanine (G) du codon Ala qui est porté par l'isolat analysé. L'allèle est considéré présent pour un score p supérieur ou égale à 90 % : la valeur 1 lui a été attribuée. L'allèle est absent pour un score de moins de 10 % : la valeur 0 lui a été attribuée. Entre ces deux seuils, l'allèle est considéré mixte au locus analysé. Le score 1-p de l'autre allèle est déduit (**Figure 12**). En mode SNP, seul est précisé si le nucléotide A, T ou leur combinaison A/T est présent au locus étudié. Aucun pourcentage n'est indiqué. Ce mode a été utilisé pour l'analyse des fragments du gène *pfert*. La proximité des loci SNP 72 à 76 a rendu difficile la détermination en mode 'AQ' des probabilités de présence de chaque base nucléotidique (**Figure 13**).

2.2.6 - Polymorphisme de la longueur des microsatellites

2.2.6.1 - Amplification primaire par PCR multiplex

Les extraits d'ADN génomique pur ont subi deux types d'amplification. D'abord une amplification par PCR multiplex, puis une seconde amplification par héli-nested PCR.

La PCR multiplex est une technique d'amplification au cours de laquelle plusieurs couples d'amorces spécifiques différentes ont été introduits dans le milieu réactionnel afin d'amplifier des fragments portant les différents loci d'intérêt. Cette technique a été réalisée en suivant trois étapes.

2.2.6.1.1 - Étape pré-analytique

Une microplaque contenant 20 µL d'ADN génomique pur par puits et initialement conservée à + 4 °C a été centrifugée à 1 500 tours/min pendant quelques secondes (*Induction Drive Centrifuge*, Beckmann Model J-16). Le volume total d'extrait correspondant à l'isolat a sédimenté au fond de chaque puits, rendant plus aisé le prélèvement d'ADN. Tous les réactifs de cette expérimentation initialement conservés à - 20 °C ont aussi été décongelés à température ambiante. Il s'agit du tampon 10 X, du chlorure de magnésium (MgCl₂), des dinucléotides triphosphates (dNTPs), et trois couples d'amorces (**Annexe 13**). Avant leur décongélation complète, un microtube Eppendorf® de 1,5 mL, ou microtube 1 et une microplaque de PCR primaire ou microplaque PCR 1 ont été étiquetés puis stérilisés aux rayons ultraviolets (*UV Stratalinker® 1800*, StrataGene®). Le premix ou milieu réactionnel sans ADN a été préparé dans le microtube 1 puis distribué dans les puits de la microplaque de PCR primaire. De l'ADN génomique a été ensuite ajouté à chaque puits.

2.2.6.1.2 - Préparation du milieu réactionnel pour la PCR multiplex

Un volume de 9 µL de premix par puits a été recueilli dans 92 puits de la microplaque PCR1. Un volume d'1 µL d'ADN génomique pur a été aussi ajouté à chaque puits à l'aide d'une pipette

Plate 14 DHPS 436/437 R 032410 - Well F12;

Position 1: G: 97.8% / C: 2.2% (Passed);

Position 2: A: 2.7% / C: 97.3% (Check)

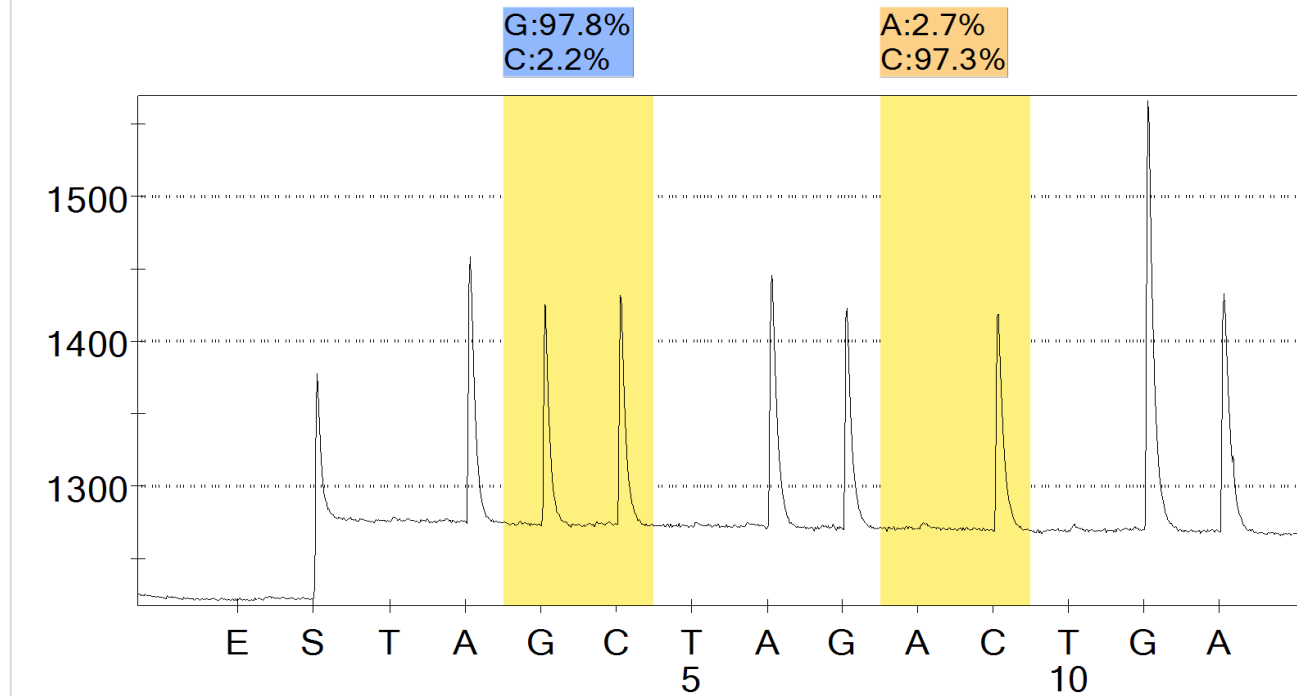


Figure 12. Pyrogramme correspondant au puits F12 de la microplaque 14 DHPS 436/437 R 032410.

Note : Les signaux obtenus en positions 1 et 2 sont effilés ou en pointes avec des tailles correspondant à la moyenne du pyrogramme. Une guanine (G) est apparue à la position 1 avec un score de 97,80 %. Il est donc considéré présent. La cytosine (C) est apparue à la position 2 avec un score de 97,30 %. L'absence du pic correspondant à l'adénine (A) indique que cette base n'existe pas sur la séquence en cours d'analyse. La valeur de 2,7 % semble indiquer le contraire. La couleur orange indique une vérification supplémentaire. L'isolat analysé porte donc une Alanine (GCT) en position 1 c'est-à-dire en position 437 de la protéine PfdHPS et une Alanine (GCT) en position 2 c'est-à-dire en position 436 de la PfdHPS.

PI 5 CRT 76 Repeat 042110 - Well A10

Entry: pfcr76

Position 1: T/T (Passed), Position 2: A/A (Passed),

Position 3: T/T (Passed), Position 4: C/C (Passed),

Position 5: A/A (Passed)

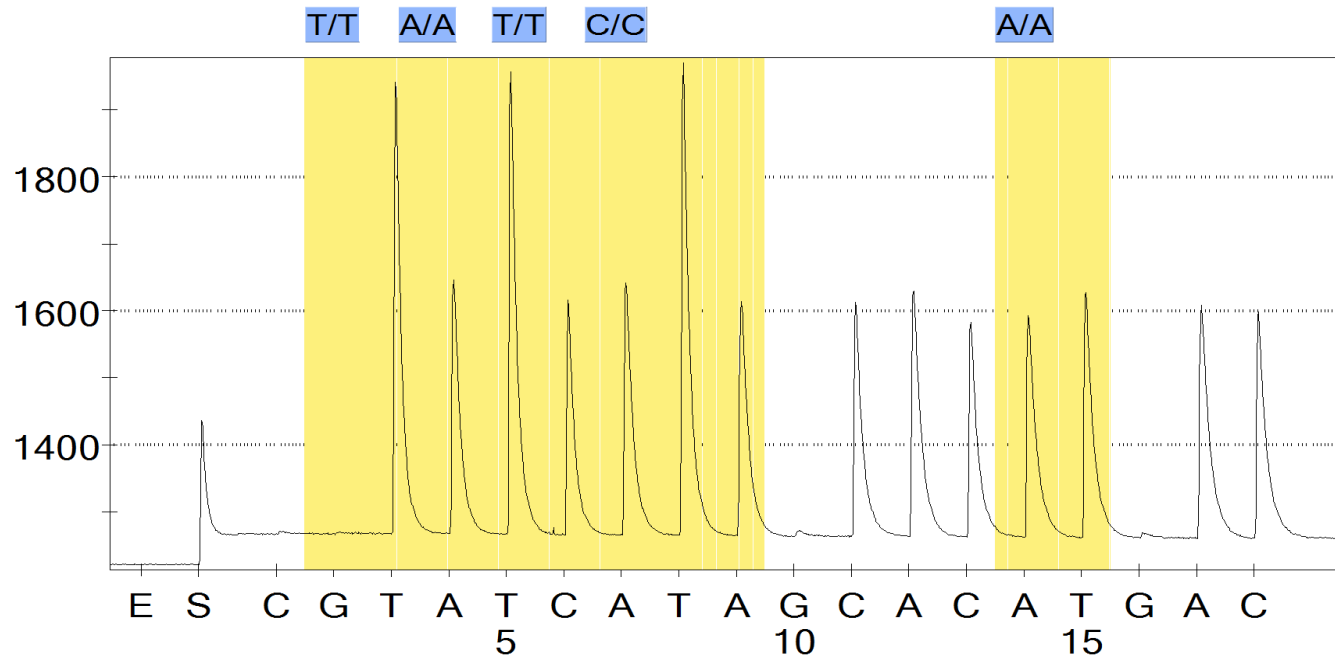


Figure 13. Pyrogramme correspondant au puits A10 de la microplaque PI5 CRT 76 Repeat 042110.

Note : Le code bleu indique une bonne qualité des signaux que l'expérimentateur confirme ensuite par leur forme en pointe et leur taille. L'amorce de la nested-PCR étant antisens 3'-5', les positions 1 à 4 correspondent aux codons 76, 75, 74 et 72, respectivement. La séquence analysée a porté l'allèle Lys-76 correspondant au codon (AAA) puisqu'une thymine (T) a été détectée à cette position. Un raisonnement similaire permet de dire que l'isolat analysé porte les allèles Asn-75, Ile-74 et Cys-72

électronique de type *EDP3-Plus*, Rainin[®] (**Annexe 13**). Les puits E12 et F12 de la microplaque PCR1 ont été réservés à deux témoins positifs dont les isolats de référence HB3 (Numéro MR4 : MRA-155 G) et 3D7 (Numéro MR4 : MRA-102 G). Les puits G12 et H12 ont recueilli les deux contrôles négatifs PNC et SNC correspondant aux premix de la première et de la seconde amplification, respectivement (**Annexe 14**). L'ADN des isolats de référence a été fourni par le MR4.

2.2.6.1.3 - PCR multiplex

Après les distributions de premix et d'ADN génomique pur, la microplaque PCR1 a été thermoscellée avec un film adhésif en aluminium (*ABgene Combi Thermosealer*) et homogénéisée pendant quelques secondes à l'aide d'un agitateur Vortex (*Genie 2™*, Fisher). Elle a ensuite été centrifugée (*Centrifugeuse Jouan C4i*, Thermoelectron Corporation) à 2000 tours/min pendant quelques secondes en vue de sédimenter le volume total de milieu réactionnel par isolat au fond du puits correspondant. Enfin, la microplaque PCR1 a été portée au thermocycleur (DNA Engine, Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler) pour une amplification de 2 h 15 min selon le programme 'Hémi-I' (**Annexe 15**).

2.2.6.2 - Amplification secondaire par hémi-nested PCR

L'hémi-nested PCR a été initialement décrite par Asnheim et Cui (1991), puis adaptée pour la caractérisation en routine des parasites de *P. falciparum* (Anderson *et al.*, 1999). L'une des amorces externes de la première amplification a été utilisée comme le complémentaire d'une amorce interne marquée au fluorochrome HEX. L'hémi-nested PCR a été réalisée en trois étapes.

2.2.6.2.1 - Préparation du milieu réactionnel

Trois milieux réactionnels ou premix différents ont été préparés à partir des réactifs utilisés pour la première amplification. Dans ces premix, deux amorces ont été utilisées dont une externe et l'autre interne. Pendant que les réactifs du premix sont à nouveau en décongélation, une microplaque de 96 puits étiquetée 'Hémi-2' ou PCR2 a été stérilisée au rayon ultra violet. Un volume de 14 µL de premix a été placé dans chaque puits de la microplaque PCR2. Puis, 1 µL de produit de la PCR multiplex a été ajouté par puits de la microplaque (**Annexe 13**).

2.2.6.2.2 - Conditionnement des témoins positifs et contrôles négatifs

Témoins positifs

Un volume de 50 µl d'ADN des isolats de référence a été fourni à une concentration de 10 ng/µl. Cette solution mère ou solution stock a subi deux dilutions pour obtenir une solution de travail. Une première dilution de la solution stock au 1/10^{ème} et une seconde dilution du diluât obtenu au 1/4. La solution de travail correspond à un volume aliquote de 20 µl du diluât final. Elle a été

conservée à + 4 °C. Afin de réduire l'effet des décongélations successives sur la qualité de l'ADN des isolats de référence, la durée d'utilisation des aliquotes de la solution de travail a été d'une semaine. Les aliquotes non utilisés et la solution stock ont été conservés à - 20 °C.

Témoins négatifs

Les contrôles négatifs essentiellement composés de premix ont été placés dans les puits G12 et H12. Pour la PCR multiplex, un volume de 10 µL de premix a été placé dans le puits G12 correspondant au premier contrôle négatif ou « PNC ». Le puits du second contrôle est alors resté vide. Au cours de la seconde amplification, un volume de 15 µL de premix de la semi-nested PCR a été placé dans le puits H12 correspondant au second contrôle négatif ou « SNC » (**Annexe 14**).

2.2.6.2.3 - Amplification par hémi-nested PCR

La microplaque PCR2 a été thermoscellée avec un film adhésif en aluminium (*ABgene Combi Thermosealer*), puis homogénéisée par agitation de quelques secondes au Vortex (*Genie 2™*, Fisher) et centrifugée à 2000 tours/min (*Centrifugeuse Jouan C4i*, Thermoelectron Corporation). Elle a ensuite été portée au thermocycleur (DNA Engine, Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler) pour une amplification d'1 h 15 min selon le programme 'HEMI-II' (**Annexe 15**).

2.2.6.3 - Scan des microsatellites

Le scan des microsatellites a été réalisé en mono-injection, c'est-à-dire que l'analyse a porté sur un locus microsatellite à la fois. Un milieu réactionnel composé d'1 µL de produit de l'amplification de l'Hémi-nested PCR, de 8,25 µL de formamide et de 0,75 µL du marqueur interne de poids moléculaire Gène Scan™ - 600 LIZ® a été préparé avant l'analyse des amplicons (**Annexe 16**). Il a servi au scan de la longueur des allèles microsatellites par l'automate *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Le marqueur Gène Scan™ - 600 LIZ® est destiné aux automates d'électrophorèse de l'ADN à fluorescence. Il sert à mesurer avec une grande précision des tailles comprises entre 20 et 600 pb grâce à 36 fragments marqués. Dans des conditions de dénaturation, chacun des 36 fragments de ce marqueur interne génère un pic dont la position sert au repérage moléculaire (**Annexe 17**).

2.2.6.4 - Analyse des résultats

2.2.6.4.1 - Allèles de microsatellites

La présence ou l'absence d'un ou de plusieurs pics d'électrophorèse intercalé(s) entre les 36 pics de l'échelle interne Gène Scan™ - 600 LIZ® a été recherchée. La forme des signaux recherchée est caractéristique d'un microsatellite donné et la taille de ces signaux varie en fonction de l'isolat analysé. Pour un microsatellite donné, un allèle est présent dans l'isolat analysé lorsque le signal détecté reproduit la forme caractéristique de l'isolat de référence (**Annexe 18**).

Le logiciel Gène Mapper 4.0 (*Applied Biosystems*, CA, USA) a permis de déterminer la forme et

la taille réelles des allèles microsatellites détectés au niveau des isolats de référence 3D7 et HB3. La forme caractéristique du signal de fluorescence obtenue pour un isolat de terrain donné a été comparée aux formes des signaux obtenues avec les isolats de référence. En cas de ressemblance, il s'agit d'un allèle du microsatellite analysé. Un score a été attribué à la taille de l'allèle observé. Les tailles des allèles devraient être comprises entre 114 et 201 pb pour le microsatellite Poly- α entre 112 et 142 pb pour TA81 et entre 159 et 192 pb pour PfpK2.

Au cas où plusieurs signaux caractéristiques sont détectés dans un même intervalle, des scores n'ont été attribués qu'aux pics mineurs de hauteurs supérieurs à 33 % de la hauteur du pic de majeur. De même, les signaux de fluorescence inférieurs à 100 unités de fluorescence n'ont pas été considérés.

2.2.6.4.2 - Détermination des fréquences alléliques

Deux méthodes de détermination des prévalences alléliques ont été utilisées (Sridaran *et al.*, 2010) afin de vérifier si les allèles mixtes modifient de façon significative les prévalences des marqueurs moléculaires de résistance analysés. La comparaison des fréquences alléliques été réalisée avec le test z au seuil de significativité $\alpha = 5\%$. Les fréquences des allèles résistants (Mu), des allèles sauvages (S) et des génotypes mixtes (Mi) ont été déterminées selon les relations suivantes proposées par Sridaran *et al.* (2010).

Méthode des fréquences combinées

La fréquence des allèles mutés a été déterminée en combinant les allèles mutés (Mu) et les allèles mixtes (Mi). Elle s'exprime comme suit :

- Prévalence des allèles mutés = $(Mu + Mi) / (Mu + Mi + S)$
- Prévalence des allèles sauvages = $S / (Mu + Mi + S)$.

Les allèles sauvages sont représentés par (S).

Méthode des fréquences non combinées

Les prévalences des allèles mutées (Mu), des allèles sauvages (S) et des génotypes mixtes (Mi) ont été déterminées séparément selon les relations proposées par Sridaran *et al.* (2010).

- Prévalence des allèles mutants = $Mu / (Mu + Mi + S)$
- Prévalence des allèles mixtes = $Mi / (Mu + Mi + S)$
- Prévalence des allèles sauvages = $S / (Mu + Mi + S)$.

2.2.7 - Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Xlstat[®], version 2010.3.08 (Addinsoft SARL, Paris, FRANCE). Les moyennes et des standards de déviations ont été déterminés. Les différences entre les taux de prévalence ont été estimées en utilisant le test z de comparaison de 2 proportions avec

la méthode de Monte-Carlo (nombre de simulation = 5000). Le seuil de significativité statistique est $\alpha < 0,05$. Pour le test unilatéral à droite (ou supérieur), les hypothèses sont les suivantes : $H_0 : z = 0$ et $H_a : z > 0$. Si H_a est retenue, alors les prévalences croissent avec la variable score. Des tests unilatéraux à droite puis à gauche ont été réalisés pour chaque allèle. La probabilité p la plus faible résultant des deux tests a été retenue (Agresti, 1990).

Le test d'indépendance entre les lignes et les colonnes

Les lignes représentent les génotypes et les colonnes indiquent les années. Le test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Méthode Monte Carlo/Nombre de simulations = 5.000) a été utilisé pour tester l'indépendance entre les génotypes et les sites géographiques en mesurant à quel point le tableau est éloigné, au sens du χ^2 , de ce qui est attendue en moyenne.

Comparaison des prévalences des marqueurs moléculaires de 2002 à 2008

Le test du χ^2 a été utilisé pour déterminer si les prévalences des marqueurs moléculaires peuvent être considérées comme étant toutes égales (hypothèse nulle H_0) ou si au moins deux prévalences sont différentes (hypothèse alternative H_a). Lorsque plusieurs cellules du tableau de contingence ont des valeurs faibles, le test du χ^2 devient peu sûr. Dans ce cas, la méthode de Monte Carlo a été utilisée.

La méthode Monte-Carlo permet de calculer une distribution du χ^2 sur la base de simulations ayant pour contrainte de respecter les effectifs totaux par année. On obtient donc une distribution empirique donnant une valeur critique plus fiable (à condition que le nombre de simulations soit important) que celle donnée par la distribution théorique du χ^2 .

La procédure de Marascuilo consiste à effectuer des tests de comparaison deux à deux pour tous les couples de proportions. Elle a permis d'identifier les proportions responsables de l'éventuel rejet de H_0 . Dans le cas où la procédure de Marascuilo n'a pas identifié de différence significative alors que le test du χ^2 rejette H_0 , un test z de comparaison de deux proportions calculées pour deux échantillons non appariés a été utilisé (Agresti, 1990; Marascuilo and Serlin, 1988).

Test unilatéral de tendance de Cochran-Armitage

Le test de Cochran-Armitage (Armitage, 1955; Cochran, 1954) permet de tester si une série de proportions peut être considérée comme variant linéairement en fonction d'une variable ordinale. Ici les proportions correspondent aux prévalences alléliques ou génotypiques et la variable ordinale correspond à la variable temps exprimée en années. Dans le cas d'un test unilatéral à gauche (ou inférieur), les hypothèses ont été les suivantes : $H_0 : z = 0$ et $H_a : z < 0$. Si H_a est retenue, les proportions décroissent lorsque la variable score croît.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 - Résultats

3.1.1 - Polymorphisme de la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine d'isolats d'enfants asymptomatiques et de patients symptomatiques vivant à Anonkoua-kouté

3.1.1.1 - Bilan du séquençage conventionnel

3.1.1.1.1 - Au niveau des asymptomatiques

La sélection aléatoire de 48 des 85 isolats pour l'analyse moléculaire a montré que le nombre de fragments d'ADN d'isolats issus d'individus asymptomatiques et séquencés a varié en fonction de la présence des loci d'intérêt sur le fragment obtenu. Pour le gène *pf dhfr*, 42 fragments portant les loci Asn-51-Ile et Cys-59-Arg ont été séquencés. Quarante-quatre fragments séquencés avec succès ont été dénombrés pour le locus Ser-108-Asn. Aucune des mutations Ile-164-Leu, Ser-108-Thr et Val-16-Ala n'a été mise en évidence.

Pour le gène *pf dhps*, 30 et 29 séquences obtenues ont portés les loci Ser-436-Ala et Ala-437-Gly, respectivement. Les loci Ala-581-Gly et Ala-613-Ser sont portés par 44 fragments séquencés avec succès. La mutation Glu-540 n'a pas été observée. Pour le gène *pf crt*, 38 fragments portant les cinq loci impliqués dans la résistance à la CQ ont été dénombrés (**Tableau X**).

3.1.1.1.2 - Au niveau des symptomatiques

L'analyse moléculaire de 65 isolats issus d'enfants symptomatiques âgés de 4-13 ans a montré que le nombre de fragments d'ADN séquencés a varié selon le gène. Pour PfdHFR, PfdHPS et *pf crt*, ce sont respectivement sur 65, 65 et 55 fragments qui ont été séquencés avec succès (Tableau XVII).

3.1.1.2 - Allèles individuels de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine

Les fréquences des allèles Ile-51, Arg-59 et Asn-108 du gène *pf dhfr* sont similaires dans les deux groupes. On note que les fréquences des allèles Arg-59 (52.3 %) et Asn-108 (52.3 %) ont été sensiblement plus élevées parmi les isolats issus des individus symptomatiques, contrairement à la fréquence de l'allèle Ile-51 (40,0 %). Avec les isolats collectés auprès des écoliers asymptomatiques, c'est plutôt l'allèle Ile-51 qui a la fréquence la plus importante (45,2 %). Par ailleurs, pour une même catégorie d'individus, les allèles Arg-59 et Asn-108 ont la même fréquence, c'est-à-dire 40,9 % pour les asymptomatiques et 52,3 % pour les symptomatiques. Les allèles mixtes ont les fréquences alléliques les plus faibles pour chaque locus chez les asymptomatiques. Malgré ces différences substantielles, aucune différence significative n'a été

Tableau X. Bilan du séquençage de l'ADN extrait d'isolats issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008 en fonction des loci.

		Ecoliers asymptomatiques : N = 48 (4-15 ans)		Patients symptomatiques : N = 67 (4-13 ans)	
Fragments séquencés	Loci	Succès	Échecs	Succès	Échecs
<i>pfdhfr</i>	Asn-51-Ile	42	6	65	2
	Cys-59-Arg	42	6	65	2
	Ser-108-Asn/Thr	44	4	65	2
<i>pfdhps</i>	Ser-436-Ala	30	18	65	2
	Ala-437-Gly	29	19	65	2
	Lys-540-Glu	48	0	65	2
	Ala-581-Gly	44	4	65	2
	Ala-613-Ser	44	4	65	2
<i>pfprt</i>	Met-74-Ile	38	10	55	12
	Asn-75-Glu	38	10	55	12
	Lys-76-Thr	38	10	55	12

mise en évidence par le test-z (**Tableau XI**).

Des différences significatives entre les individus asymptomatiques et symptomatiques ont été mises en évidence au niveau des fréquences des allèles des loci Ser-436-Ala et Ala-437-Gly du gène *pfdhps*. La fréquence de l'allèle sensible Ser-436 (35,4 %) a été plus importante au sein des isolats collectés auprès des malades (Test-z ; p = 0,010). L'allèle Gly-437 a été prédominant parmi les isolats issus de patients symptomatiques avec une fréquence de 56,9 % (Test z ; p = 0,004). Ces allèles ont été retrouvés dans 37 des 65 séquences portées par les isolats issus de ce groupe et portant le locus Ala-437-Gly. L'allèle sensible Ala-437 a été plus important dans le groupe des asymptomatiques avec une fréquence de 44,8 % contre 16,9 % au sein des symptomatiques (Test z ; p = 0,007) comme indiqué au **Tableau XI**.

En outre, deux allèles mutés rares, Gly-581 (1,5 %) et Ser-613 (3,1 %), ont été détectés uniquement dans des isolats issus d'individus symptomatiques. L'allèle Ser/Ala-436 (8,9 %) a été le seul allèle mixte retrouvé de façon significative au sein du groupe des enfants asymptomatiques (Test z ; p = 0,036) (**Tableau XI**).

3.1.1.3 - Analyse moléculaire des génotypes associés à la résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine

*3.1.1.3.1 - Génotypes correspondant au gène *pfdhfr**

Les génotypes triple mutant **IRNI** et sensible NCSI ont été majoritaire dans les deux catégories d'individus avec des fréquences respectives de 50,0 % et 33,3 % pour les asymptomatiques et 47,7 % et 30,8 % pour les patients symptomatiques. Le génotype **NRNI** a été plus observé au sein d'isolats issus des individus symptomatiques. Les génotypes **ICNI** et **ICSI** ont été détecté avec de faibles fréquences au niveau des isolats issus d'écoliers asymptomatiques, c'est-à-dire 4,8 % pour l'un et 2,4 % pour l'autre. Le génotype **IRSI** a été retrouvé parmi les isolats issus des deux catégories d'individus. Aucune différence significative entre fréquences n'a été notée pour le gène *pfdhfr* (**Tableau XII**).

*3.1.1.3.2 - Génotypes correspondant au gène *pfdhps**

Sur les 9 génotypes détectés pour le gène *pfdhps* la fréquence du double mutant **AGKAA** a été la plus prédominante avec respectivement 39,3 % pour dans le groupe des asymptomatiques et 47,7 % dans le groupes des enfants malades. Le génotype **AAKAA** a été plus important au niveau des isolats de participants asymptomatiques (35,7 %) tandis que le génotype simple mutant **SGKAA** a été prédominant au sein des isolats de patients symptomatiques (32,3 %). Des différences significatives de fréquences ont été notée ces deux génotypes (Test z ; p = 0,018 pour **AAKAA** et p = 0,001 pour **SGKAA**) le gène *pfdhfr*. Enfin, le génotype sensible SAKAA a été présent avec une fréquence de 7,1 %, c'est-à-dire le cinquième de la fréquence de **AAKAA** du groupe des

Tableau XI. Distribution des allèles des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfCRT* au sein d'isolats issus des individus symptomatiques et asymptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008

Codon	Allèles	Asymptomatiques		Symptomatiques		p du test -z
		n	(%)	n	(%)	
DHFR-51	Ile (I)	19	(45,2)	26	(40,0)	0,593
	Asn (N) / Ile (I)	06	(14,3)	08	(12,3)	0,767
	Asn (N)	17	(40,5)	31	(47,7)	0,461
DHFR-59	Arg (R)	18	(40,9)	34	(52,3)	0,238
	Cys (C) / Arg (R)	07	(15,9)	11	(16,9)	0,888
	Cys (C)	19	(43,2)	20	(30,8)	0,187
DHFR-108	Asn (N)	18	(40,9)	23	(52,3)	0,561
	Ser (S) / Asn (N)	07	(15,9)	08	(12,3)	0,599
	Ser (S)	19	(43,2)	34	(34,4)	0,347
DHPS-436	Ala (A)	13	(43,3)	29	(44,6)	0,907
	Ser (S) / Ala (A)	10	(33,3)	13	(20,0)	0,180
	Tyr (Y) / Ala (A)	02	(6,8)	00	(0,0)	0,143
	Tyr (Y) / Ser (S)	01	(3,3)	00	(0,0)	0,309
	Ser (S)	04	(13,3)	23	(35,4)	0,010
DHPS-437	Gly (G)	08	(27,6)	37	(56,9)	0,004
	Ala (A) / Gly (G)	08	(27,6)	17	(26,1)	0,885
	Ala (A)	13	(44,8)	11	(16,9)	0,007
DHPS-540	Glu (E)	01	(2,2)	00	(0,0)	0,312
	Lys (K)	44	(97,8)	65	(100,0)	0,312
DHPS-581	Gly (G)	00	(0,0)	01	(1,5)	0,314
	Ala (A)	45	(100)	64	(98,5)	0,314
DHPS-613	Ser (S)	00	(0,0)	02	(3,1)	0,151
	Ala (A) / Ser (S)	04	(8,9)	00	(0,0)	0,036
	Ala (A)	41	(91,1)	63	(96,9)	0,221
CRT-74	Ile (I)	26	(68,4)	33	(60,0)	0,408
	Met (M) / Ile (I)	9	(23,7)	13	(23,6)	0,991
	Met (M)	3	(7,9)	9	(16,4)	0,229
CRT-75	Glu (E)	26	(68,4)	35	(63,6)	0,632
	Asn (N) / Glu (E)	9	(23,7)	13	(23,6)	0,991
	Asn (N)	3	(7,9)	7	(12,7)	0,462
CRT-76	Thr (T)	26	(68,4)	35	(63,6)	0,632
	Lys (K) / Thr (T)	9	(23,7)	15	(27,3)	0,697
	Lys (K)	2	(7,9)	5	(9,1)	0,839

Notes : Les lettres majuscules dans la colonne "allèle" représente le code à une lettre des aminoacides. Les aminoacides mutés sont en gras. Les fréquences déterminées correspondent au nombre d'observations sur le nombre de succès par locus comme précisé au **tableau III**. Les p significatifs < 0, 05 sont indiquées en gras. IC 95 % indique l'intervalle de confiance à 95 % autour de la différence des fréquences entre enfants asymptomatiques et participants symptomatiques.

Tableau XII. Distribution des génotypes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr*t au sein d'isolats issus des individus symptomatiques et asymptomatiques à Anonkoua-kouté en 2008.

Gènes	Génotypes	Asymptomatiques		Symptomatiques		p du test-z
		n	Fréquences (%)	n	Fréquences (%)	
<i>pfdhfr</i>	<u>IRNI</u>	21	(50,0)	31	(47,7)	0,816
	NCSI	14	(33,3)	20	(30,8)	0,782
	<u>NRNI</u>	3	(7,1)	11	(16,9)	0,110
	<u>ICNI</u>	2	(4,8)	0	(0,0)	0,147
	<u>IRSI</u>	1	(2,4)	3	(4,6)	0,524
	<u>ICSI</u>	1	(2,4)	0	(0,0)	0,311
<i>pfdhps</i>	<u>AGKAA</u>	11	(39,3)	31	(47,7)	0,449
	<u>AAKAA</u>	10	(35,7)	8	(12,3)	0,018
	<u>SGKAA</u>	2	(7,1)	21	(32,3)	0,001
	SAKAA	2	(7,1)	2	(3,1)	0,444
	<u>YGKAS</u>	1	(3,6)	0	(0,0)	0,309
	<u>YAKAA</u>	1	(3,6)	0	(0,0)	0,309
	<u>A/YGKAS</u>	1	(3,6)	0	(0,0)	0,309
	<u>AAKGA</u>	0	(0,0)	1	(1,5)	0,314
	<u>AGKAS</u>	0	(0,0)	2	(3,1)	0,151
<i>pfcr</i> t	<u>CVIET</u>	35	(92,1)	46	(83,7)	0,234
	CVMNK	3	(07,9)	5	(09,1)	0,839
	<u>CVMET</u>	0	(0,0)	2	(03,6)	0,237
	<u>CVMNT</u>	0	(0,0)	2	(03,6)	0,237

Notes : Une lettre majuscule dans la colonne "génotypes" représente le code à une lettre des aminoacides. Les aminoacides mutés sont en gras. Les fréquences déterminées correspondent au nombre d'observations sur le nombre de succès par gène, soit 42 et 65 pour le gène *pfdhfr*, 28 et 65 pour gène *pfdhps*, et 38 et 55 pour gène *pfcr*t dans le groupe des enfants asymptomatiques et des participants symptomatiques, respectivement. Par ailleurs, les allèles mixtes ont été considérés comme allèles mutants dans ce tableau. Les p significatifs < 0,05 sont indiqués en gras. IC 95 % correspond à l'intervalle de confiance à 95 % autour de la différence des fréquences entre enfants asymptomatiques et participants symptomatiques.

asymptomatiques d'une part, et une fréquence de 3,1 % représentant environ le quart de la fréquence de AAKAA au sein des écoliers symptomatiques (**Tableau XII**).

Deux génotypes ont été retrouvés au sein des isolats de patients symptomatiques uniquement. L'un, AGKAS (3,1 %), porte la mutation Ala-613-Ser et l'autre, AAKGA de fréquence 1,5 %, a la mutation Ala-581-Gly. Les trois génotypes déterminés au niveau des isolats issus des enfants asymptomatiques uniquement portent l'allèle Tyr-436 donnant ainsi au locus Ser-436-Ala un caractère quadrimorphe avec les allèles Tyr-436, Ala/Tyr-436 en plus des allèles Ser-436 et Ala-436 (**Tableau XII**).

*3.1.1.3.3 - Combinaison des génotypes *pfdhfr* et *pfdhps**

Parmi les 18 génotypes combinés des gènes *pfdhfr* et *pfdhps*, l'haplotype composé du triple mutant IRNI et le double mutant SGEAA n'a pas été observé à Anonkoua-kouté. L'haplotype sensible NCSI/SAKAA a été présent avec une fréquence faible (4,6 %). Quant au quintuple mutant IRNI/AGKAA, il a été le plus prédominant dans les deux groupes, soit 27,3 % chez les enfants asymptomatiques et 33,8 % pour les enfants malades. Aucune différence significative n'a été déterminée (**Tableau XIII**).

En combinant les effectifs des enfants de cette étude, la fréquence des haplotypes quintuple mutant IRNI/AAKAA et IRNI/AGKAA a été plus importante (Test z ; p = 0,024) dans la tranche 4-8 ans par rapport à la tranche des plus de 8 ans. Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre le sexe de l'enfant et les haplotypes du **tableau XIV**.

Conclusion partielle

À Anonkoua-kouté, les fréquences des génotypes conférant la résistance à la SP et à la CQ en 2008 ont atteint des niveaux comparables entre isolats d'écoliers asymptomatiques et ceux issus d'enfants symptomatiques. Les seules différences significatives concernent les proportions des génotypes AAKAA (35,7 % parmi les asymptomatiques) et SGKAA (32,3 % au sein des symptomatiques). L'usage à long terme de la SP, aux sulfamides et de la CQ à Anonkoua-kouté pourrait favoriser la sélection d'isolats portant les allèles rares Gly-581 (1,5 %) et Ser-613 (3,1 %).

3.1.2 - Analyse moléculaire des marqueurs conférant la résistance à la

Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine à Bonoua et Samo

3.1.2.1 - Bilan du séquençage

L'analyse a montré que l'ADN de 97 isolats a pu être amplifié, 48 à Bonoua et 49 à Samo, indiquant des taux de réussite de 72,7 et de 94,2 %, respectivement. Les gènes *pfdhfr* et *pfdhps* ont été séquencés avec un taux de réussite plus élevé à Bonoua qu'à Samo, avec des probabilités

Tableau XIII. Allèles *pfdhfr/pfdhps* mis en évidence en 2008 à Anonkoua-kouté en Côte d'Ivoire.

Haplotypes	Haplotypes <i>pfdhps</i> et <i>pfdhfr</i>								Asymptomatiques		Symptomatiques		p du test-z
	N51I	C59R	S108N	S436A	A437G	K540E	A581G	A613S	n	Proportion (%)	n	Proportion (%)	
Quintuple	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	A	7	(31,8)	23	(35,3)	0,758
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	<u>S</u>	6	(27,3)	22	(33,8)	
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	<u>S</u>	0	(0,0)	1	(1,5)	
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	K	A	<u>S</u>	1	(4,5)	0	(0,0)	
Quadruple	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	A	K	A	A	6	(27,3)	16	(24,6)	0,807
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	S	<u>G</u>	K	A	A	4	(18,2)	3	(4,6)	
	<u>I</u>	<u>R</u>	S	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	A	0	(0,0)	7	(10,8)	
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	A	0	(0,0)	1	(1,5)	
Trois mutations au plus	N	C	S	<u>A</u>	A	K	A	A	2	(9,1)	5	(7,7)	0,940
	N	C	S	S	A	K	A	A	9	(40,8)	26	(39,9)	
	N	C	S	<u>A</u>	A	K	<u>G</u>	A	3	(13,6)	0	(0,0)	
	N	C	S	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	A	0	(0,0)	3	(4,6)	
	N	C	S	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	<u>S</u>	0	(0,0)	1	(1,5)	
	N	C	S	S	<u>G</u>	K	A	A	2	(9,1)	2	(3,1)	
	N	C	S	<u>A</u>	<u>G</u>	K	A	<u>S</u>	0	(0,0)	1	(1,5)	
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	A	K	A	A	0	(0,0)	13	(20)	
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	S	<u>G</u>	K	A	A	0	(0,0)	3	(4,6)	
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	S	A	K	A	A	0	(0,0)	2	(3,1)	
	N	<u>R</u>	<u>N</u>	S	A	K	A	A	0	(0,0)	1	(1,5)	
	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	S	A	K	A	A	0	(0,0)	1	(1,5)	
	<u>I</u>	C	<u>N</u>	S	A	K	A	A	3	(13,6)	0	(0,0)	
<u>I</u>	C	<u>N</u>	S	A	K	A	A	1	(4,5)	0	(0,0)		

Note : Les sommes des proportions en première ligne de chaque catégorie d'haplotype ont été comparées.

Tableau XIV. Allèles *pfhfr/pfhps* mis en évidence en 2008 à Anonkoua-kouté en Côte d'Ivoire.

Haplotypes <i>pfhfr</i> et <i>pfhps</i>	8-13 ans vs. 4-8 ans	Féminin vs. Masculin
	n=36 vs. n=53	n=45 vs. n=44
Quintuple: <u>IRNI-AGKAA</u>	22,20% vs. 18,90% (p = 0,671 ; -0,13 – 0,21)	31,1% vs. 31,1% (p = 0,943 ; -0,20 – 0,19)
Quintuple : <u>IRNI-AGKAS</u>	2,80% vs. 1,90% (p = 0,779 ; -0,06 – 0,07)	2,2% vs. 0,0% (p = 0,312 ; - 0,02 – 0,07)
Quadruple : <u>IRSI-AGKAA</u>	5,60% vs. 3,80% (p = 0,687 ; -0,07 – 0,11)	0,0% vs. 0,0%
Quadruple : <u>NRNI-AGKAA</u>	8,30% vs. 7,40% (p = 0,874 ; -0,11 – 0,12)	0,0% vs. 0,0%
Quadruple : <u>IRNI-AAKAA</u> <u>IRNI-SGKAA</u>	13,90% vs. 34,00% (p = 0,024 ; -0,36 – -0,03)	15,6% vs. 13,3% (p = 0,798 ; -0,13 ; 0,17)
Au plus trois mutations		
NCSI- <u>AAKAA</u>		
NCSI- <u>SAKAA</u>		
NCSI- <u>AAKGA</u>		
NCSI- <u>AGKAA</u>		
NCSI- <u>AGKAS</u>	47,20% vs. 34,00% (p = 0,186 ; -0,07 – 0,35)	51,1% vs. 53,3% (p = 0,745 ; -0,24 – 0,17)
NCSI- <u>SGKAA</u>		
<u>NRNI-AAKAA</u>		
<u>NRNI-SGKAA</u>		
<u>NRNI-SAKAA</u>		
<u>IRNI-SAKAA</u>		
<u>ICNI-SAKAA</u>		

p respectives de 0,007 et 0,045 (**Tableau XV**).

3.1.2.2 - Fréquences des allèles de résistance à la SP et à la CQ

Les fréquences des allèles purs du gène *pfdhfr* ont été importantes à Bonoua où la mutation au locus Ser-108-Asn a été retrouvée dans 24 des 46 fragments séquencés. Elle a été retrouvée sur 14 des 31 isolats de Samo, soit 45 %. Ces différences de fréquences n'ont pas été significatives (Test-z ; méthode de Monte-Carlo). Au contraire, des différences significatives ont pu être observées entre les deux localités avec les allèles mixtes Cys/Arg-59 (Test-z ; méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,002$) et Ser/Asn-108 (Test-z ; méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,001$). Ces allèles ont été prédominants à Samo. L'allèle Ser/Asn-108 n'a pas été observé à Bonoua (**Tableau XVI**).

Le locus Ser-436-Ala du gène *pfdhps* a été le plus polymorphe avec cinq allèles purs dont les allèles rares Tyr-436 et Phe-436 ayant chacun une fréquence de 3 % et retrouvé au sein des isolats de patients de la localité de Samo. L'allèle Gly-437 a été porté par tous les isolats des patients de Bonoua contre 73 % à Samo (Test-z : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$). Aucune mutation n'a été observée au locus Ala-581-Gly dans les deux localités. L'allèle muté Ser-613 a été détecté dans seulement 10 % des isolats de Samo (Test-z : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,034$) comme présenté au **tableau XVI**.

L'allèle Ser/Leu-436 a été le plus prédominant des deux allèles mixtes de Bonoua. Il a été retrouvé sur 24 des 41 fragments retenus, avec une fréquence de 59 %. Il n'a pas été retrouvé à Samo. Les allèles mixtes Ala/Gly-437 et Ala/Ser-613 n'ont été retrouvés qu'à Samo dans de faibles proportions, c'est-à-dire 3 et 7 %, respectivement. Aucune différence significative de la fréquence du mixte Ser/Ala-436 n'a été observée entre Bonoua et Samo (Test-z : méthode de Monte-Carlo) comme l'indique le **tableau XVI**.

Au sein des isolats issus de Bonoua, les allèles Ile-74 et Glu-75 du gène *pfprt* ont une fréquence de 100 %, plus élevée que celle des isolats des symptomatiques de Samo, avec des probabilités p respectives de 0,0004 et 0,02 (Test-z : méthode de Monte-Carlo). A Samo, l'allèle Ile-74 a été porté par 38 des 47 isolats, soit une fréquence de 81 %. L'allèle Glu-75 a une fréquence du même ordre avec 85 %, c'est-à-dire observé sur 40 des 47 séquences obtenues (**Tableau XVI**).

3.1.2.3 - Fréquences des génotypes de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine à Bonoua et Samo en 2005

3.1.2.3.1 - Génotypes du gène *pfdhfr*

L'analyse des 46 et 31 fragments obtenus respectivement à partir des isolats de Bonoua et de Samo a permis de mettre en évidence 9 génotypes dont trois purs et 6 mixtes rares (< 5 %). Dans

Tableau XV. Bilan de séquençage de l'ADN des isolats collectés à Bonoua et à Samo en 2005 en Côte d'Ivoire.

Sites	Echantillons collectés	Echantillons extraits	Echantillons amplifiés avec succès (%)	Echantillons séquencés avec succès (%)		
				<i>pdfhr</i>	<i>pdfhps</i>	<i>pfcr</i>
Bonoua	69	66	48 (40,7)	46 (39,0)	41 (34,8)	48 (40,7)
Samo	63	52	49 (41,5)	31 (26,3)	30 (25,4)	44 (37,3)
<i>Total</i>	<i>132</i>	<i>118</i>	<i>97 (82,2)</i>	<i>77 (65,3)</i>	<i>71 (60,2)</i>	<i>92 (78,0)</i>
p du test-z	-	-	0,557	0,007	0,045	0,277

Note : Les taux de succès d'amplification par PCR et par séquençage ont été calculés sur la base du nombre d'extrait d'ADN obtenus par site. IC 95 : Intervalle de confiance à 95 % autour de la différence des proportions.

Tableau XVI. Distribution des allèles des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr* portés par des isolats issus de symptomatiques venus de Bonoua et Samo en 2005.

Gènes	Locus	Allèles	Bonoua		Samo		p du test-z
			Proportions	(%)	Proportions	(%)	
<i>pfdhfr</i>	N51I	Ile (I)	15/46	(33,0)	06/31	(19,0)	0,090
		Asn (N)/ Ile (I)	31/46	(67,0)	16/31	(52,0)	0,082
	C59R	Arg (R)	23/46	(50,0)	13/31	(42,0)	0,242
		Cys (C)/ Arg (R)	01/46	(2,0)	08/31	(26,0)	0,002
	S108N/T	Asn (N)	24/46	(52,0)	14/31	(45,0)	0,272
		Ser (S)/ Asn (N)	00/46	(0,0)	07/31	(23,0)	0,001
<i>pfdhps</i>	S436A	Phe (F)	00/41	(0,0)	01/30	(3,0)	0,264
		Tyr (Y)	00/41	(0,0)	01/30	(3,0)	0,264
		Ser (S)/ Ala (A)	13/41	(32,0)	07/30	(23,0)	0,215
		Ser (S)/ Leu (L)	24/41	(59,0)	00/30	(0,0)	<0,0001
	A437G	Gly (G)	41/41	(100,0)	22/30	(73,0)	<0,0001
		Ala (A)/ Gly (G)	00/41	(0,0)	01/30	(3,0)	0,264
	A581G	Ala (A)	42/42	(100,0)	30/30	(100,0)	-
	A613S	Ser (S)	00/42	(0,0)	03/30	(10,0)	0,036
		Ala (A)/ Ser (S)	00/42	(0,0)	02/30	(7,0)	0,008
<i>pfcr</i>	M74I	Ile (I)	48/48	(100,0)	38/47	(81,0)	0,0004
		Met (M)/ Ile (I)	00/48	(0,0)	02/47	(4,0)	0,227
	N75E	Glu (E)	48/48	(100,0)	40/47	(85,0)	0,002
		Asn (N)/ Glu (E)	00/48	(0,0)	01/47	(2,0)	0,325
	K76T	Thr (T)	48/48	(100,0)	40/42	(95,0)	0,074
		Lys (K)/ Thr (T)	00/48	(0,0)	01/42	(2,0)	0,325

Notes : Les lettres majuscules de la colonne “allèle” représente le code lettre des aminoacides. Les aminoacides mutés sont en gras et soulignés. Le dénominateur de chaque fraction représente le nombre total d’isolats séquencés avec succès pour un le locus considérés. Les p significatifs ont été indiqués en gras.

les sites d'étude, le génotype sensible NCSI a été plus répandu que le triple mutant **IRNI** avec 50 et 38,7 % pour Bonoua et 32,6 et 19,7 % pour Samo. Le génotype double mutant **NRNI** a été le moins représenté. Les fréquences déterminées à Bonoua ont été plus élevées que celles de Samo. Seul le génotype N-C/**R**-SI sur les 6 génotypes mixtes a été retrouvé à Bonoua (**Tableau XVII**). Aucune différence significative n'a été notée au niveau des génotypes de *pfdhfr* (Test-z : méthode de Monte-Carlo).

3.1.2.3.2 - Génotypes du gène *pfdhps*

L'analyse moléculaire des 41 et 30 séquences du gène *pfdhps* retenue pour Bonoua et Samo, respectivement, a permis de détecter sept génotypes purs dont **SGKAA** est commun aux deux localités. A Samo, trois génotypes purs prédominants ont soit la mutation Ser-436-Ala, soit la mutation Ala-437-Gly, soit les deux. C'est le cas avec **AAKAA** détecté sur 3 des 30 séquences, c'est-à-dire 10 % de fréquence. C'est aussi le cas avec **SGKAA** retrouvé sur 7 des 30 ou 23,3 % des séquences retenues ou avec **AGKAA** mis en évidence sur 8 des 30 (26,6 %) des séquences. L'analyse a montré que parmi les quatre génotypes rares détectés à Samo, la mutation au locus Ala-613-Ser a été mise en évidence dans trois combinaisons inhabituelles. Il s'agit des génotypes **FAKAS**, **YAKAS** et **AGKAS** détectées à Samo avec une fréquence de 3,3 % chacun. Le génotype sensible SAKAA a été aussi détecté dans ce groupe ; il n'a pas été observé à Bonoua (**Tableau XVII**).

Un des cinq génotypes mixtes, S/**A-GKAA**, a été déterminé dans les deux localités avec des fréquences de 31,7 % à Bonoua et 13,3 % à Samo. La différence entre les fréquences a été significative (Test-z : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,027$). Le second génotype mixte de Bonoua S/**L-GKAA** a une fréquence élevée de 58,5 %, c'est-à-dire retrouvé dans 24 séquences sur 41. Quant aux 3 autres allèles mixtes, S/**A-GKA-A/S**, **A-G/A-KAA** et S/**A-G/A-KAA**, ils ont été observés uniquement à Samo avec des fréquences de 6,7 ; 3,3 et 3,3 %, respectivement (**Tableau XVII**).

3.1.2.3.3 - Génotypes du gène *pfprt*

Le génotype **CVIET** a été très prédominant à Bonoua et à Samo avec des fréquences respectives de 100 et 86,2 %. Ce génotype a été le seul déterminé parmi les isolats issus de Bonoua. A Samo, il a été le génotype majoritaire. Six autres génotypes de fréquences inférieures à 5 % y ont été détectés dont le sensible CVMNK et des mixtes ayant les mutations Asn-75-Glu et Lys-76-Thr. En 2005, une importante variabilité génétique de *pfprt* a été notée à Samo avec sept génotypes mis en évidence, tandis qu'à Bonoua elle a été très réduite avec un seul génotype déterminé (**Tableau XVII**). Aucune différence significative n'a été notée entre les fréquences des génotypes sensibles des trois gènes sur les deux sites. Par contre, les fréquences des génotypes mutants des gènes

Tableau XVII. Distribution des génotypes des gènes *pf dhfr*, *pf dhps* et *pf crt* portés par des isolats issus symptomatiques venus de Samo et Bonoua.

Gènes	Génotypes		Bonoua		Samo		p du test-z
			Effectif	(%)	Effectif	(%)	
<i>pf dhfr</i>	Purs	NCSI	23	(50,0)	12	(38,7)	0,162
		IRNI	15	(32,6)	6	(19,4)	0,329
		NRNI	7	(15,2)	3	(9,7)	0,202
	Mixtes	N/I-C/R-S/N-I	0	(0,0)	6	(19,4)	0,002
		N/I-C/R-SI	0	(0,0)	1	(3,2)	0,222
		N/I-CSI	0	(0,0)	1	(3,2)	0,222
		N/I- RNI	0	(0,0)	1	(3,2)	0,222
		N-C/R-S/N-I	0	(0,0)	1	(3,2)	0,222
		N-C/R-SI	1	(2,2)	0	(0,0)	0,406
		Total	46	(100,0)	31	(100,0)	
<i>pf dhps</i>	Purs	AGKAA	0	(0,0)	8	(26,7)	0,0004
		SGKAA	4	(9,8)	7	(23,3)	0,386
		AAKAA	0	(0,0)	3	(10,0)	0,039
		AGKAS	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
		FAKAS	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
		SAKAA	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
		YAKAS	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
	Mixtes	S/ A-G KAA	13	(31,7)	4	(13,3)	0,027
		S/ A-G KA-A/ S	0	(0,0)	2	(6,7)	0,093
		A-G /A-KAA	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
		S/ A-G /A-KAA	0	(0,0)	1	(3,3)	0,241
		S/ L-G KAA	24	(58,5)	0	(0,0)	< 0,0001
		Total	41	(100,0)	30	(100,0)	
		<i>pf crt</i>	Purs	CVIET	48	(100,0)	38
CVMET	0			(0,0)	1	(2,3)	0,291
CVMNK	0			(0,0)	1	(2,3)	0,291
Mixtes	CVM/I-N/ E-I		0	(0,0)	1	(2,3)	0,291
	CVM/I-N/ E- K/I		0	(0,0)	1	(2,3)	0,291
	CVME- K/I		0	(0,0)	1	(2,3)	0,291
	CVM/N- E-K/I		0	(0,0)	1	(2,3)	0,291
	Total		48	(100,0)	44	(100,0)	

pfdhfr et *pfcr* et des génotypes mixtes *pfdhps* ont été plus élevées au sein des isolats issus de Bonoua. La diversité génétique relative à ces trois gènes a été plus grande à Samo (**Tableau XVIII**).

Conclusion partielle

Au niveau des symptomatiques vivants à Bonoua et Samo, des niveaux comparables de fréquences ont pu être déterminés malgré les faciès épidémiologiques propres à chacune des deux localités. Cependant, la diversité allélique a été plus grande dans la localité rurale de Samo avec plusieurs génotypes de fréquences inférieures à 5 % dont les doubles mutant **FAKAS** (3,3 %), **YAKAS** (3,3 %), ou le triple mutant **AGKAS** (3,3 %). Comparés à Samo, les isolats issus de Bonoua ont une diversité allélique très réduite avec 4 génotypes associés au gène *pfdhfr*, trois génotypes pour le gène *pfdhps* dont le mixte **SL-GKAA** (58,5 %), et le génotype **CVIET** (100 %) pour le gène *pfcr*. En l'absence de l'allèle Glu-540 ou du génotype **FGKAS**, l'allèle Gly-437 est un bon marqueur de surveillance de la résistance au sein des isolats issus d'Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo. Le niveau de la pression de sélection qui existe dans ces sites exige une surveillance régulière de l'efficacité de la SP actuellement recommandée en prophylaxie chez la femme enceinte.

3.1.3 - Bilan des analyses effectuées par pyroséquençage

Sur un ensemble de 991 individus dont les confettis ont été collectionnés, 726 extraits purs ont été obtenus. Parmi ces extraits purs, 708 ont été amplifiés soit un rendement de 97,52 %. Pour un gène donné, l'effectif des produits d'amplification pyroséquencés a varié selon le locus et l'année de collecte des confettis (**Tableau II**).

3.1.4 - Répartition géographique des marqueurs moléculaires de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine

3.1.4.1 - Fréquences des allèles de résistance portés par les gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfcr*.

3.1.4.1.1 - Au niveau du gène *pfdhfr*

L'analyse a révélé des différences significatives (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo) entre les fréquences des allèles mutants déterminées à partir des isolats issus d'Anonkoua-kouté, d'Ayamé et de Dabakala. La fréquence de l'allèle Ile-51 a varié entre 12 et 34 % (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,0004$). Les fréquences les plus élevées ont été observées à Anonkoua-kouté (30 %) et Ayamé (34 %). La fréquence de l'allèle Arg-59 est passée de 14 à 39 % (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$), avec des valeurs maximales déterminées à Anonkoua-kouté (36 %) et à Ayamé (39 %). Les fréquences de l'allèle Asn-108 à Anonkoua-kouté (49 %) et à Ayamé (54 %) ont été les plus élevées (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$)

Tableau XVIII. Fréquences cumulées des génotypes et des génotypes mixtes à Bonoua et Samo en 2005.

Gènes	Génotypes	Bonoua		Samo		p du test-z
		Proportions	(%)	Proportions	(%)	
<i>pfdhfr</i>	Sensible	23/46	(50,0)	12/31	(38,7)	0,162
	Mutant	22/46	(47,8)	9/31	(29,0)	0,044
	Mixte	1/46	(2,2)	10/31	(32,3)	0,0004
<i>pfdhps</i>	Sensible	0/41	(0,0)	1/30	(3,3)	0,845
	Mutant	4/41	(9,8)	21/30	(70,0)	0,0001
	Mixte	37/41	(90,2)	8/30	(26,7)	<0,0001
<i>pfcr1</i>	Sensible	0/48	(0,0)	1/44	(2,3)	0,844
	Mutant	48/48	(100,0)	39/44	(88,7)	0,009
	Mixte	0/48	(0,0)	4/44	(9,0)	0,030

(Tableau XIX).

Les fréquences de deux allèles sauvages du gène *pfdhfr* sur les quatre analysés ont été significativement différentes (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo). Il s'agit de l'allèle Cys-59 dont les fréquences déterminées à partir des isolats provenant d'Anonkoua-kouté (35 %) et de Dabakala (34 %) ont été plus importantes que celle obtenue avec les isolats issus d'Ayamé (18 %) (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,022$). De même, la fréquence de l'allèle Ser-108 déterminée à Anonkoua-kouté (31 %) a été presque similaire (méthode de Marascuilo) à celle déterminée à partir des échantillons provenant de Dabakala (37 %), mais différente (méthode de Marascuilo) de la proportion de cet allèle à Ayamé (20 %) **(Tableau XIX)**.

Des différences significatives ont aussi été mises en évidence avec les allèles mixtes des loci Cys-59-Arg et Ser-108-Asn/Thr avec des probabilités p égales à 0,005 et 0,001, respectivement (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo). La fréquence de l'allèle mixte Cys/Arg variant de 29 à 52 % a été prédominante à Ayamé (42 %) et Dabakala (52 %). La méthode de Marascuilo indique que les fréquences des allèles mixtes du locus Ser-108-Asn/Thr déterminées à Anonkoua-kouté (20 %) et Ayamé (26 %) ont été plus faibles que celle détectée à Dabakala (45 %) **(Tableau XIX)**.

*3.1.4.1.2 - Au niveau du gène *pfdhps*.*

Une différence significative (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$) a été observée avec les prévalences de l'allèle Gly-437 du gène *pfdhps* avec des valeurs maximales déterminées à Anonkoua-kouté (65 %) et Ayamé (64 %). Les différences de prévalences de deux allèles sensibles de ce gène ont été significatives avec une probabilité $p = 0,002$ (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo). La procédure de Marascuilo indique que l'allèle Ser-436 a été prédominant à Anonkoua-kouté avec un taux de 33 %, tandis que l'allèle Ala-437 a été prédominant à Anonkoua-kouté (17 %) et Dabakala avec 13 % **(Tableau XX)**.

De même, des différences significatives entre les fréquences des deux allèles mixtes Ser/Ala-436 et Ala/Gly-437 ont été mises en évidence (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo). La fréquence de 57 % de l'allèle Ser/Ala-436 observée à Dabakala a été plus élevée (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,003$) que les taux de 32 et 47 % obtenus à Anonkoua-kouté et Ayamé, respectivement. De même, la différence des fréquences de l'allèle mixte Ala/Gly-437 a été significative (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$) avec une prédominance de 51 % à Dabakala selon la procédure de Marascuilo **(Tableau XX)**.

*3.1.4.1.3 - Au niveau du gène *pfprt**

Des différences significatives de fréquences ont été mises en évidence entre sites d'étude (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo). Pour les allèles mutants, c'est-à-dire Ile-74, Glu-75 et Thr-76, les fréquences les plus importantes ont été déterminées à Anonkoua-kouté (47, 47 et 46 %, respectivement).

Tableau XIX. Répartition des allèles du gène *pfdhfr* à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009

Loci <i>pfdhfr</i>	Allèles	Anonkoua-kouté (Abidjan)		Ayamé		Dabakala		p < 0,05 (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo)
		Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	
Cys-50-Arg	Arg (R)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	-
	Cys (C)	77	(0,96)	96	(0,98)	117	(1,00)	-
	Mixte (C/R)	3	(0,04)	2	(0,02)	0	(0,00)	-
	Total N	80	(1,00)	98	(1,00)	117	(1,00)	-
Asn-51-Ile	Ile (I)	24	(0,30)	33	(0,34)	14	(0,12)	0,0004
	Asn (N)	34	(0,43)	34	(0,35)	54	(0,46)	-
	Mixte (N/I)	22	(0,28)	31	(0,32)	49	(0,42)	-
	Total N	80	(1,00)	98	(1,00)	117	(1,00)	-
Cys-59-Arg	Arg (R)	28	(0,36)	36	(0,39)	16	(0,14)	< 0,0001
	Cys (C)	27	(0,35)	17	(0,18)	39	(0,34)	0,022
	Mixte (C/R)	22	(0,29)	39	(0,42)	60	(0,52)	0,005
	Total N	77	(1,00)	92	(1,00)	115	(1,00)	-
Ser-108-Asn/Thr	Asn (N)	36	(0,49)	49	(0,54)	16	(0,17)	< 0,0001
	Thr (T)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	-
	Ser (S)	23	(0,31)	18	(0,20)	34	(0,37)	0,039
	Mixte	15	(0,20)	24	(0,26)	43	(0,46)	0,001
	Total N	74	(1,00)	91	(1,00)	93	(1,00)	-

Tableau XX. Répartition des allèles du gène *pf dhps* à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009

Loci <i>pf dhps</i>	Allèles	Anonkoua-kouté (Abidjan)		Ayamé		Dabakala		p < 0,05 (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo)
		Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	
Ser-436-Ala	Ala (A)	26	(0,36)	33	(0,37)	32	(0,30)	-
	Ser (S)	24	(0,33)	15	(0,17)	13	(0,12)	0,002
	Mixte (S/A)	23	(0,32)	42	(0,47)	60	(0,57)	0,003
	Total N	73	(1,00)	90	(1,00)	105	(1,00)	-
Ala-437-Gly	Gly (G)	50	(0,65)	56	(0,62)	42	(0,36)	< 0,0001
	Ala (A)	13	(0,17)	5	(0,06)	15	(0,13)	-
	Mixte (A/G)	14	(0,18)	29	(0,32)	59	(0,51)	< 0,0001
	Total N	77	(1,00)	90	(1,00)	116	(1,00)	-
Lys-540-Glu	Glu (E)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	-
	Lys (K)	74	(0,93)	94	(0,96)	116	(1,00)	-
	Mixte (K/E)	6	(0,08)	4	(0,04)	0	(0,00)	-
	Total N	80	(1,00)	98	(1,00)	116	(1,00)	-

respectivement) puis à Ayamé avec 45, 45 et 43 %, respectivement (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p < 0,0001$ pour chaque allèle). Au contraire, les allèles sauvages Met-74, Asn-75 et Lys-76, ont été prédominantes à Dabakala avec des fréquences respectives de 60, 61 et 62 % (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo ; $p = 0,0004$ pour Met-74, $p = 0,0003$ pour Asn-75, $p = 0,0001$ pour Lys-76) (**Tableau XXI**).

3.1.4.2 - Répartition géographique des génotypes des gènes *pf dhfr* et *pf dhps*

3.1.4.2.1 - Génotypes du gène *pf dhfr*

Parmi les 8 génotypes déterminés sur l'ensemble des trois sites, 7 ont été mis en évidence à Anonkoua-kouté (Abidjan), 5 à Ayamé et 4 à Dabakala. L'analyse a révélé une différence significative entre les fréquences du génotype triple mutant **IRNI** ($\chi^2 = 9,376$; DDL = 2 ; $p = 0,009$). Selon la procédure de Marascuilo, les fréquences déterminées à Anonkoua-kouté (23,61 %) et à Ayamé (22,35 %) sont proches l'une de l'autre au point de former un ensemble distinct celui auquel appartiendrait la fréquence déterminée à Dabakala (7,69 %). Les génotypes mixtes ont les fréquences les plus élevées sur chaque site (**Tableau XXII**).

Des génotypes de fréquences inférieures à 5 % ont été détectés dans quelques uns des trois sites. Les génotypes simple mutant **NRSI** et **NCNI** ont été mis en évidence respectivement à Ayamé (1,18 %) et à Anonkoua-kouté (1,39 %). Quant au génotype **ICSI**, il a été détecté à Anonkoua-kouté (1,39 %). Le double mutant **ICNI**, a été retrouvé à Anonkoua-kouté et à Ayamé, avec des fréquences respectives de 2,78 et 1,18 %. A Dabakala, seul le génotype **IRSI** a été mis en évidence avec une fréquence de 1,10 % (**Tableau XXII**).

3.1.4.2.2 - Génotypes du gène *pf dhps*

Les fréquences du simple mutant **SGKAA** ont été les seuls à être significativement différents (Chi-deux = 6,160 ; DDL = 2 ; $p = 0,042$) dans leur répartition géographique. Ce génotype a été observé avec une fréquence de 24,66 % à Anonkoua-kouté et 17,05 % à Ayamé dans le Sud, puis 10,58 % à Dabakala au Nord (**Tableau XXIII**).

En outre, l'analyse a indiqué la présence de trois autres génotypes associés au gène *pf dhps* dans les trois sites d'étude. Il s'agit des haplotypes **AAKAA**, **SGKAA**, **AGKAA**, et du génotype mixte. Le génotype sensible SAKAA n'a pas été observé dans le groupe d'Ayamé. Les génotypes purs (c'est-à-dire non mixtes) portant l'allèle Gly-437 ont été les plus observés au niveau des isolats issus de chacune de ces localités (**Tableau XXIII**).

3.1.4.3 - Répartition géographique des génotypes associés au gène *pf crt*

Tableau XXI. Répartition des allèles du gène *pfcr1* à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala au cours de la période 2008-2009.

Loci <i>pfcr1</i>	Allèles	Anonkoua-kouté (Abidjan)		Ayamé		Dabakala		p < 0,05 (Test de χ^2 : méthode de Monte-Carlo)
		Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	Effectif n	(Proportions)	
Cys-72-Ser	Ser (S)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	-
	Cys (C)	58	(0,97)	88	(1,00)	84	(1,00)	-
	Mixte (S/C)	2	(0,03)	0	(0,00)	0	(0,00)	-
	Total N	60	(1,00)	88	(1,00)	84	(1,00)	-
Met-74-Ile	Ile (I)	34	(0,47)	42	(0,45)	24	(0,21)	< 0,0001
	Met (M)	27	(0,37)	33	(0,35)	69	(0,60)	0,0004
	Mixte (M/I)	12	(0,16)	18	(0,19)	22	(0,19)	-
	Total N	73	(1,00)	93	(1,00)	115	(1,00)	-
Asn-75-Glu	Glu (E)	32	(0,47)	39	(0,45)	21	(0,19)	< 0,0001
	Asn (N)	23	(0,34)	34	(0,39)	67	(0,61)	0,0003
	Mixte (N/E)	13	(0,19)	14	(0,16)	21	(0,19)	-
	Total N	68	(1,00)	87	(1,00)	109	(1,00)	-
Lys-76-Thr	Thr (T)	31	(0,46)	39	(0,43)	20	(0,18)	< 0,0001
	Lys (K)	23	(0,34)	34	(0,38)	68	(0,62)	0,0001
	Mixte (K/T)	13	(0,19)	17	(0,19)	21	(0,19)	-
	Total N	67	(1,00)	90	(1,00)	109	(1,00)	-

Tableau XXII. Répartition des haplotypes du gène *pfdfhr* à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala en 2008-2009.

Sites	Taille des échantillons (N)	NCSI		IRNI		NRNI		NRSI	
		n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)
Anonkoua-kouté	72	17	(23,61)	17	(23,61)	6	(8,33)	0	(0,00)
Ayamé	85	15	(17,65)	19	(22,35)	5	(7,06)	1	(1,18)
Dabakala	91	28	(30,77)	7	(7,96)	3	(3,30)	0	(0,00)
χ^2 observé		4,145		9,376		2,027		1,925	
χ^2 critique		6,044		5,935		6,016		2,365	
DDL		2		2		2		2	
p		0,123		0,009		0,388		0,623	

NCNI		ICSI		ICNI		IRSI		Mixtes	
n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)
1	(1,39)	1	(1,39)	2	(2,78)	0	(0,00)	28	(38,89)
0	(0,00)	0	(0,00)	1	(1,18)	0	(0,00)	43	(59,59)
0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(1,10)	52	(57,14)
2,454		2,454		2,597		1,732		5,409	
2,362		2,361		5,451		2,36		5,966	
2		2		2		2		2	
0,287		0,282		0,197		0,627		0,071	

Note : Le test du χ^2 comparant les fréquences des génotypes déterminées sur les trois sites a été réalisé en utilisant la méthode de Monte-Carlo avec un nombre de simulations égale à 5000. Pour un génotype donné, les fréquences ont ensuite été comparées deux à deux selon la procédure de Marascuilo. Cette procédure attribue à un même groupe les fréquences non significativement différentes. Selon cette procédure, il n'y a pas de différence significative entre les fréquences déterminées à Ayamé et Anonkoua-kouté pour le génotype triple mutant IRNI. Par ailleurs, 8, 13 et 26 extraits d'ADN n'ont pu être séquencés pour les sites respectifs d'Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala. Les lettres en gras et en bleu indiquent le symbole à une lettre de l'acide aminé mutant et sa position.

Tableau XXIII. Répartition des haplotypes du gène *pdfhps* à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala en 2008-2009 en Côte d'Ivoire.

Sites	Taille des échantillons (N)	SAKAA		AAKAA		SGKAA		AGKAA		Mixtes	
		n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)
Anonkoua-kouté	73	1	(1,37)	8	(10,96)	18	(24,66)	15	(20,55)	31	(42,47)
Ayamé	88	0	(0,00)	5	(05,68)	15	(17,05)	22	(25,00)	46	(52,27)
Dabakala	104	1	(0,96)	9	(08,65)	11	(10,58)	18	(17,31)	65	(62,50)
χ^2 observé		1,097		1,487		6,160		1,718		7,013	
χ^2 critique		4,451		6,037		5,948		5,839		5,835	
DDL		2		2		2		2		2	
p		0,736		0,456		0,042		0,446		0,026	

Note : Le test du χ^2 comparant les fréquences des génotypes déterminées sur les trois sites a été réalisé en utilisant la méthode de Monte-Carlo (avec 5000 simulations). Une différence significative entre les fréquences de du génotype SGKAA a été mise en évidence. Cependant, la comparaison des fréquences deux à deux par la procédure de Marascuilo en attribuant les trois fréquences au même groupe indique qu'elles ne sont pas significatives. Le test z utilisé en dernier recours indique que seule la différence des génotypes entre Anonkoua-kouté et Dabakala a été significative (Test z : z obs. = -2,677 ; z critique = 1,960 ; p bilatéral = 0,009). Un effectif de 7, 10 et 13 extraits d'ADN n'ont pu être séquencés à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala, respectivement. Les lettres en gras et en bleu indiquent l'acide aminé muté et sa position.

Les génotypes triple mutant **CVIET**, sensible CVMNK et mixtes ont été mis en évidence après l'analyse du gène *pfcr*t. Les fréquences du triple mutant **CVIET** ont été significativement (Chi-deux = 19,931 ; DDL=2 ; $p < 0,0001$) plus élevées à Anonkoua-kouté (46,27 %) et Ayamé (43,33%) par rapport à Dabakala (18,35 %). Au contraire, les fréquences du génotype sensible CVMNK ont été significativement plus faibles à Anonkoua-kouté (23 %) et Ayamé (33 %) comparées à celui de 60,55 % obtenu avec les confettis de Dabakala (Chi-deux = 16,126 ; DDL = 2 ; $p = 0,0003$) comme indiqué au **tableau XXIV**.

Conclusion partielle

En 2008, les prévalences des mutants PfdHFR **IRNI**, PfdHPS **SGKAA** et PfcRT **CVIET** ont été plus élevées à Anonkoua-kouté (Abidjan) et à Ayamé, tandis que le génotype sensible CVMNK a été prédominant à Dabakala. Ce qui indique des niveaux modérés de résistance à la SP et à la CQ à Anonkoua-kouté (Abidjan) et Ayamé et une sensibilité de *P. falciparum* à la CQ à Dabakala. Certes, ces données ne peuvent être inférées à l'ensemble du pays à cause du faible effectif des sites d'étude. Cependant, elles pourraient résulter d'une dynamique à moyen ou long terme des marqueurs moléculaires comme celle étudiée à Anonkoua-kouté entre 2002 et 2009.

3.1.5 - Evolution des marqueurs moléculaires de résistance à la Sulfadoxine-pyriméthamine et à la Chloroquine à Anonkoua-kouté de 2002 à 2008

3.1.5.1 - Evolution des prévalences des allèles des gènes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcr*t

3.1.5.1.1 - Tendances déterminées en combinant les prévalences des allèles mutant et des mixtes

*Au niveau du gène *pfdhfr**

Sur la base de leurs prévalences moyennes, les allèles peuvent être regroupés en 2 catégories distinctes. Dans la première catégorie qui regroupe les allèles Asn-108, Arg-59 et Ile-51, les taux de prévalence moyenne sont compris entre 54 et 62 %. Au cours de la période d'étude, les prévalences les plus élevées ont été obtenues avec l'allèle Asn-108 avec un pic de 69,4 % observé en 2006. Les taux de prévalence les plus faibles ont été observés avec l'allèle Ile-51, tandis que des taux presque similaires ont été déterminés en 2002-2003 et 2007 avec les allèles Arg-59 et Asn-108. La seconde catégorie a regroupé les allèles rares dont Thr-108 et Arg-50 de prévalences moyennes 3,8 et 1,4 %. Le pic de prévalence de l'allèle Arg-50 a été atteint en 2006 (12 %) tandis que la prévalence maximale de l'allèle Thr-108 a été observée au début de l'étude, c'est-à-dire en 2002 (**Tableau XXV**).

Les prévalences des cinq allèles résistants ont varié en fonction de l'année d'observation. Quatre d'entre elles ont augmenté significativement (Test de Cochran-Armitage ; $z > 0$). Il s'agit de la

Tableau XXIV. Répartition des haplotypes du gène *pfcr* à Anonkoua-kouté (Abidjan), Ayamé et Dabakala en 2008-2009 en Côte d'Ivoire.

Sites	Taille des échantillons (N)	CVIET		CVMNK		Mixtes	
		n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)	n	Fréquence (%)
Anonkoua-kouté	67	31	(46,27)	23	(34,33)	13	(19,40)
Ayamé	90	39	(43,33)	33	(36,67)	18	(20,00)
Dabakala	109	20	(18,35)	66	(60,55)	23	(21,10)
χ^2 observé		19,931		16,126		0,082	
χ^2 critique		6,103		5,980		5,992	
DDL		2		2		2	
p		< 0,0001		0,0003			

Note : Pour le génotype triple mutant CVIET, la procédure de Marascuilo indique que les fréquences déterminées à Anonkoua-kouté et Ayamé sont similaires (χ^2 observé = 0,029 ; χ^2 critique = 0,196) comparée à celles déterminées entre Anonkoua-kouté et Dabakala (χ^2 observé = 0,279 ; χ^2 critique = 0,175) ou celles obtenues entre Ayamé et Dabakala (χ^2 observé = 0,250 ; χ^2 critique = 0,157). De même, les fréquences du génotype CVMNK déterminées à Anonkoua-kouté et Ayamé sont très proches l'une de l'autre (χ^2 observé = 0,023 ; χ^2 critique = 0,189) comparées à celles de Dabakala et Anonkoua-kouté (χ^2 observé = 0,262 ; χ^2 critique = 0,182) ou celles obtenues à Dabakala et Ayamé (χ^2 observé = 0,239 ; χ^2 critique = 0,169). Un effectif de 13, 8 et 8 extraits n'ont pu être séquencés à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala, respectivement.

Tableau XXV. Dynamique des allèles combinés (mixtes et mutants) des gènes *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf crt* à Anonkoua-kouté de 2002 à 2008.

Gènes	Allèles	2002-2003			2005			2006			2007			2008			Prévalence moyenne	Test de Cochrane-Armitage	
		n	N	(n/N)	n	N	(n/N)	n	N	(n/N)	n	N	(n/N)	n	N	(n/N)		p	z > 0 ou z < 0
<i>pf dhfr</i>	Asn (AAC) - 108	63	121	(0,52)	38	62	(0,61)	50	72	(0,69)	62	95	(0,65)	50	75	(0,67)	0,62	0,009	z > 0
	Arg (CGT) - 59	70	138	(0,51)	37	65	(0,56)	55	84	(0,65)	67	103	(0,65)	49	77	(0,64)	0,60	0,008	z > 0
	Ile (ATT) - 51	64	141	(0,45)	35	66	(0,53)	51	91	(0,56)	63	103	(0,61)	48	80	(0,60)	0,54	0,004	z > 0
	Arg (CGT) - 50	00	141	(0,00)	00	67	(0,00)	11	91	(0,12)	03	103	(0,03)	03	80	(0,04)	0,038	0,018	z > 0
	Thr (ACC) - 108	04	121	(0,03)	01	62	(0,02)	01	72	(0,01)	00	95	(0,00)	01	75	(0,01)	0,014	0,049	z < 0
<i>pf dhps</i>	Gly (GGT) - 437	103	137	(0,75)	55	65	(0,85)	89	100	(0,89)	86	102	(0,84)	64	77	(0,83)	0,83	0,040	z > 0
	Glu (GAA) - 540	2	143	(0,01)	3	67	(0,04)	1	94	(0,01)	0	102	(0,00)	06	80	(0,08)	0,02	0,027	z > 0
	Ala (GCT) - 436	84	132	(0,64)	38	64	(0,59)	69	100	(0,69)	77	102	(0,76)	49	73	(0,67)	0,67	0,072	-
<i>pf crt</i>	Ser (AGT) - 72	0	89	(0,00)	1	64	(0,02)	9	73	(0,12)	1	93	(0,01)	2	60	(0,03)	0,03	0,196	-
	Ile (ATI) - 74	86	127	(0,68)	43	65	(0,66)	68	90	(0,76)	72	99	(0,73)	46	73	(0,63)	0,69	0,497	-
	Glu (GAA) - 75	77	111	(0,69)	41	62	(0,66)	63	83	(0,76)	64	87	(0,74)	45	63	(0,71)	0,71	0,213	-
	Thr (ACA) - 76	76	110	(0,69)	41	62	(0,66)	63	83	(0,76)	64	87	(0,74)	44	67	(0,66)	0,70	0,407	-

prévalence de l'allèle Asn-108 qui, en 2002-2003, a été portée par 63 des 121 isolats, soit une prévalence de 52,10 %. Finalement, le taux prévalence est passée à 67 %, d'où l'augmentation de la prévalence de 2002 à 2008 ($p = 0,009$; $z > 0$). En 2006, il a été retrouvé dans 50 des 72 isolats, ce qui correspond au pic de 69 % observé. De même, la prévalence de l'allèle Arg-59 qui a été de 51 % en 2002-2003 est passée à 64 % en 2008-2009 ($p = 0,008$; $z > 0$). Le pic de prévalences a été atteint 65 % observé en 2006 puis n'a presque pas varié jusqu'en fin d'étude en 2009. Les prévalences des allèles Ile-51 ont augmenté elles aussi de 45 à 60 % avec un pic de 61 % obtenu en 2007 ($p = 0,004$; $z > 0$). Il en a été de même pour l'allèle Arg-50 été détecté pour la première fois en 2006 avec une prévalence de 12,1 %. De 2002 à 2008, la prévalence de l'allèle Arg-50 a augmenté significativement ($p = 0,018$; $z > 0$) au cours de la période étudiée. Le taux de prévalence de l'allèle Thr-108 a une évolution différente de celles observées jusque-là. Le taux a baissé significativement de 3,0 à 1,0 % de la première à la dernière année d'étude (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,049$; $z < 0$). En 2007, l'allèle n'a pas été observé dans la population étudiée (**Tableau XXV**).

Au niveau du gène pfdhps

Les prévalences alléliques moyennes du gène *pfdhps* ont été éloignées les unes des autres. La prévalence moyenne de l'allèle Gly-437 est restée la plus élevée sur toute la période étudiée avec des taux variant entre 75 et 89 %. La prévalence de l'allèle Ala-436 a, quant à elle, varié de 64 à 76 % avec une moyenne de 67,00 %. Celle de l'allèle Glu-540, c'est-à-dire 2,0 % a été la plus faible avec un pic de 8 % atteint au cours de la dernière année d'étude. Les prévalences des allèles Gly-437 et Glu-540 du gène *pfdhps* ont augmenté significativement pendant la période d'étude (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,040$; $z > 0$). En effet, la prévalence de l'allèle Gly-437 en 2002-2003 a été de 75,0 %. Cette prévalence est passée à 83,0 % en 2008-2009 après un pic de 89 % atteint en 2006. La prévalence de l'allèle Glu-540 a aussi augmenté au cours de la période d'étude (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,027$; $z > 0$). De 1,0 % en 2002-2003, c'est-à-dire détecté sur 2 des 143 isolats, sa prévalence est passée à 7,50 % en 2008-2009. Les prévalences de l'allèle Ala-436 n'ont indiqué aucune variation significative (**Tableau XXV**).

Au niveau du gène pfcrt

Deux catégories distinctes de prévalences alléliques ont été mises en évidence. Dans la première catégorie comprend les allèles Ile-74, Glu-75 et Thr-76 dont les prévalences moyennes sont du même ordre, soit respectivement 69, 71 et 70 %. Les prévalences des trois allèles ont toutes atteint le pic de 76,0 % en 2006. Dans la seconde catégorie constituée par l'allèle Ser-72, la prévalence moyenne a été très faible (3,0 %) avec un pic de 12 % atteint aussi en 2006. Aucune des variations de prévalences observées avec le gène *pfcrt* a été significative (**Tableau XXV**).

3.1.5.1.2 - Tendances déterminées en séparant les prévalences des allèles mutant et mixtes

Au niveau du gène pfdhfr

En séparant les prévalences des allèles mutants de celle des allèles mixtes, les tendances des prévalences de ces deux allèles ont pu être mises en évidence en plus de celles des allèles sensibles. Parmi les allèles mutants purs du gène *pfdhfr*, seules les prévalences de l'allèle Asn-108 ont augmenté de façon significative (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,023$; $z > 0$). La prévalence est passée de 36 % en 2002-2003 à un taux de 49 % en 2008-2009 avec une moyenne fluctuant entre 37,4 et 49,8 %. Les prévalences de l'allèle mutant Thr-108 ont été rares à Anonkoua-kouté. L'allèle n'a été observé qu'en 2002-2003 avec un taux de prévalence de 1,7 %, d'où la baisse significative de sa prévalence au cours de la période de l'étude (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,025$; $z < 0$) (**Tableau XXVI**).

Les prévalences de deux allèles mixtes ont augmenté significativement (Test de Cochran-Armitage ; $z > 0$). De 17 % en 2002-2003, la prévalence de l'allèle Cys/Arg-59 a atteint sa valeur maximale de 29 % à la fin de l'étude ($p = 0,037$; $z > 0$). Absent en début d'étude, l'allèle Cys/Arg-51 n'a été observé que 3 fois (4 %) sur les 80 séquences en 2008-2009 après un pic de 11 % détecté en 2006 ($p = 0,017$; $z > 0$). Les taux de prévalences moyennes de ces génotypes mixtes ont oscillé entre 16,3 et 28,1 % pour l'allèle Cys/Arg-59 et 14,7 et 26,10 % pour l'allèle Cys/Arg-51 (**Tableau XXVI**).

Les prévalences de tous les allèles sensibles ont diminué significativement (Test de Cochran-Armitage ; $z < 0$). Avec l'allèle Ser-108, les prévalences ont été de 45 % au début puis sont passées à 31 % à la fin de la période de l'étude significativement avec une moyenne générale comprise entre 28,8 et 43,6 % ($p = 0,017$; $z < 0$). Au niveau de l'allèle Cys-59, les prévalences ont diminué de 50 début à 35 % à la fin de l'étude ($p = 0,004$; $z < 0$), avec une prévalence moyenne comprise entre 31,2 à 48,0 %. La prévalence de l'allèle Cys-59 s'est maintenue à 35 % de 2006 à 2009. Depuis 2002-2003 où il a été mis en évidence avec une prévalence de 55 %, l'allèle Asn-51 a atteint 43 % en 2008-2009 ($p = 0,009$; $z < 0$), avec une prévalence moyenne comprise entre 38,2 et 53 %. La plus faible prévalence (39 %) a été observée en 2007. La prévalence de l'allèle Cys-50 a diminué de 100 % au début de l'étude à 96 % en fin d'étude, avec une moyenne générale comprise entre 90,1 et 100,0 % et une prévalence minimale de 88 % en 2006. La prévalence a baissé significativement ($p = 0,018$; $z < 0$) comme indiqué dans le **tableau XXVI**.

Au niveau du gène pfdhps

Les prévalences de l'allèle Ser-436 ont été les seules du locus à avoir baissé significativement (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,025$; $z < 0$) avec une valeur initiale de 39 %, un pic de 41 %

Tableau XXVI. Dynamique des allèles du gène *pdfhfr* à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.

Loci <i>pdfhfr</i>	Allèles	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochran-Armitage	
		n	n/N	n	n/N	n	n/N	n	n/N	n	n/N			p	z > 0 ou z < 0
Cys-50-Arg	Arg (R)	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(0,01)	0	(0,00)	0	(0,00)	0,002	0,901 - 1,023	0,454	-
	Cys (C)	141	(1,00)	67	(1,00)	80	(0,88)	100	(0,97)	77	(0,96)	0,96		0,018	z < 0
	Mixte (C/R)	0	(0,00)	0	(0,00)	10	(0,11)	3	(0,03)	3	(0,04)	0,03		0,017	z > 0
	Total (N)	141	(1,00)	67	(1,00)	91	(1,00)	103	(1,00)	80	(1,00)	-		-	-
Asn-51-Ile	Ile (I)	40	(0,28)	21	(0,32)	34	(0,37)	46	(0,45)	24	(0,30)	0,34	0,260 - 0,428	0,063	-
	Asn (N)	77	(0,55)	31	(0,47)	40	(0,44)	40	(0,39)	34	(0,43)	0,45	0,382 - 0,530	0,009	z < 0
	Mixte (N/I)	24	(0,17)	14	(0,21)	17	(0,19)	17	(0,17)	22	(0,28)	0,20	0,147 - 0,261	0,089	-
	Total (N)	141	(1,00)	66	(1,00)	91	(1,00)	103	(1,00)	80	(1,00)	-	-	-	
Cys-59-Arg	Arg (R)	46	(0,34)	24	(0,37)	34	(0,40)	46	(0,45)	28	(0,36)	0,35	0,331 - 0,437	0,151	-
	Cys (C)	68	(0,50)	28	(0,43)	29	(0,35)	36	(0,35)	27	(0,35)	0,39	0,312 - 0,480	0,004	z < 0
	Mixte (C/R)	23	(0,17)	13	(0,20)	21	(0,25)	21	(0,20)	22	(0,29)	0,22	0,163 - 0,281	0,037	z > 0
	Total (N)	137	(1,00)	65	(1,00)	84	(1,00)	103	(1,00)	77	(1,00)	-	-	-	
Ser-108-Asn/Thr	Asn (N)	43	(0,36)	26	(0,42)	32	(0,44)	45	(0,47)	36	(0,49)	0,43	0,374 - 0,498	0,023	z > 0
	Thr (T)	2	(0,02)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0,0004	-	0,025	z < 0
	Ser (S)	55	(0,45)	24	(0,39)	22	(0,31)	33	(0,35)	23	(0,31)	0,36	0,288 - 0,436	0,017	z < 0
	Mixte	21	(0,17)	12	(0,19)	18	(0,25)	17	(0,18)	15	(0,20)	0,19	0,159 - 0,237	0,325	-
	Total (N)	121	(1,00)	62	(1,00)	72	(1,00)	95	(1,00)	74	(1,00)	-	-	-	

en 2005-2006, et une valeur finale de 33 %. La moyenne générale de cet allèle a oscillé entre 25,8 et 41,80 %. La prévalence de l'allèle sensible Ala-437 a aussi baissé significativement (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,043$; $z < 0$), puisqu'elle a chuté de 25 à 17 %. La prévalence a atteint un taux minimum de 11 % en 2006 avec une moyenne comprise entre 10,1 et 23,1 %. Au contraire, la prévalence de l'allèle Gly-437 a connu une augmentation significative (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,028$; $z > 0$) avec un taux moyen compris entre 56,9 et 73,9 %. Les prévalences ont évolué de 54 % en 2002-2003 à 65 % en 2008-2009 avec un pic de 72 % en 2006. Les prévalences de l'allèle mixte n'ont pas évolué de manière significative (**Tableau XXVII**).

Les prévalences de l'allèle mixtes Lys/Glu-540 ont été les seules du locus à croître de manière significative (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,027$; $z > 0$). L'allèle a été identifié une seule fois sur 143 isolats, puis a atteint une valeur maximale de 8 % en 2008-2009 où il a été ensuite détecté parmi 6 des 80 isolats retenus alors. L'allèle sensible Lys-540 a été le plus prédominant des allèles du locus avec une prévalence moyenne oscillant entre 93,8 et 100 % (**Tableau XXVII**).

*Au niveau du gène *pfcr**

Les prévalences des allèles mixtes associés au gène *pfcr* ont été les seules à varier significativement au cours de l'étude (Test de Cochran-Armitage ; $z > 0$). La prévalence de l'allèle Met/Ile-74 a été de 9 % en 2002-2003 et de 16 % à la fin de l'étude, avec une prévalence minimale de 2 % obtenue en 2006 ($p = 0,023$; $z > 0$). Les prévalences des l'allèle Asn/Glu-75 et Lys/Thr-76 ont tous deux augmenté significativement partant de 10 % au début de l'étude à une prévalence de 19 % ($p = 0,019$ pour l'allèle Asn/Glu-75 et $p = 0,024$ pour l'allèle Lys/Thr-76, respectivement; $z > 0$) à la fin de l'étude. Une baisse de 2 % a été notée en 2005 et 5 % en 2006 pour Asn/Glu-75. La prévalence de l'allèle mixte Lys/Thr-76 a chuté en 2005 avec un taux de 3 %. L'allèle Ser-72 a été totalement absent de la population étudiée (**Tableau XXVIII**).

*3.1.5.2 - Evolution des prévalences des génotypes des gènes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcr**

*3.1.5.2.1 - Au niveau du gène *pfdhfr**

L'analyse a montré que les prévalences de trois génotypes dont les haplotypes sensible NCSI, le simple mutant NCNI et le double mutant IRSI ont varié de façon significative. Les prévalences du génotype sensible NCSI ont diminué (Test de Cochran-Armitage ; $p < 0,0001$; $z < 0$) de 2002 à 2008. Au début de la période d'investigation, cet allèle a été porté par 49 isolats sur 143, soit une prévalence de 34,3 %. Le génotype sensible a été porté par 17 des 80 isolats retenus au cours de la dernière année d'étude, soit une prévalence de 21,3 % et une moyenne fluctuant de 14,4 à 32,8 %. Le génotype IRSI a été observé sur 6 des 103 séquences analysées de l'année 2007, soit une prévalence de 6 %. Cet allèle a augmenté significativement (Test de Cochran-Armitage ; $p =$

Tableau XXVII. Dynamique des allèles du gène *pdfhps* à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.

Loci <i>pdfhps</i>	Allèles	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochran-Armitage	
		n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)			p	z > 0 ou z < 0
Ser-436-Ala	Ala (A)	49	(0,36)	25	(0,39)	35	(0,35)	58	(0,57)	26	(0,36)	0,40	0,291 - 0,521	0,063	-
	Ser (S)	52	(0,39)	26	(0,41)	31	(0,31)	25	(0,24)	24	(0,33)	0,33	0,258 - 0,418	0,025	z < 0
	Mixte (S/A)	34	(0,25)	13	(0,20)	34	(0,34)	19	(0,19)	23	(0,31)	0,26	0,175 - 0,345	0,276	-
Total (N)		135	(1,00)	64	(1,00)	100	(1,00)	102	(1,00)	73	(1,00)		-	-	-
Ala-437-Gly	Gly (G)	74	(0,54)	44	(0,69)	72	(0,72)	68	(0,67)	50	(0,65)	0,65	0,569 - 0,739	0,028	z > 0
	Ala (A)	34	(0,25)	9	(0,14)	11	(0,11)	16	(0,15)	13	(0,17)	0,16	0,101 - 0,231	0,043	z < 0
	Mixte (A/G)	29	(0,21)	11	(0,17)	17	(0,17)	18	(0,18)	14	(0,18)	0,18	0,162 - 0,202	0,281	-
Total (N)		137	(1,00)	64	(1,00)	100	(1,00)	102	(1,00)	77	(1,00)		-	-	-
Lys-540-Glu	Glu (E)	1	(0,01)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0,002	-	0,069	-
	Lys (K)	141	(0,98)	64	(0,96)	93	(0,99)	102	(1,00)	74	(0,93)	0,97	0,938 - 1,010	0,053	-
	Mixte (K/E)	1	(0,01)	3	(0,04)	1	(0,01)	0	(0,00)	6	(0,07)	0,02	-	0,027	z > 0
Total (N)		143	(1,00)	67	(1,00)	94	(1,00)	102	(1,00)	80	(1,00)		-	-	-

Tableau XXVIII. Dynamique des allèles du gène *pfcr* à Anonkoua-kouté au cours de la période de 2002 à 2008.

Loci <i>pfcr</i>	Allèles	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochran-Armitage	
		n	n/N	n	n/N	n	n/N	n	n/N	n	n/N			p	z > 0 ou z < 0
Cys-72-Ser	Ser (S)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0,00	-	0,5	-
	Cys (C)	89	(1,00)	63	(0,98)	64	(0,88)	92	(0,99)	58	(0,97)	0,96	0,904 - 1,024	0,196	-
	Mixte (S/C)	0	(0,00)	1	(0,02)	9	(0,12)	1	(0,01)	2	(0,03)	0,03	-	0,196	-
	Total (N)	89	(1,00)	64	(1,00)	73	(1,00)	93	(1,00)	60	(1,00)	-	-	-	-
Met-74-Ile	Ile (I)	75	(0,59)	42	(0,65)	61	(0,68)	60	(0,61)	34	(0,47)	0,60	0,500 - 0,700	0,109	-
	Met (M)	41	(0,32)	22	(0,34)	22	(0,24)	27	(0,27)	27	(0,37)	0,30	0,243 - 0,373	0,497	-
	Mixte (M/I)	11	(0,09)	1	(0,01)	7	(0,08)	12	(0,12)	12	(0,16)	0,09	0,030 - 0,158	0,023	z > 0
	Total (N)	127	(1,00)	65	(1,00)	90	(1,00)	99	(1,00)	73	(1,00)	-	-	-	-
Asn-75-Glu	Glu (E)	66	(0,59)	40	(0,65)	59	(0,71)	54	(0,63)	32	(0,47)	0,60	0,497 - 0,719	0,128	-
	Asn (N)	34	(0,31)	21	(0,34)	20	(0,24)	23	(0,26)	23	(0,34)	0,29	0,241 - 0,355	0,409	-
	Mixte (N/E)	11	(0,10)	1	(0,01)	4	(0,05)	10	(0,11)	13	(0,19)	0,09	0,013 - 0,175	0,019	z > 0
	Total (N)	111	(1,00)	62	(1,00)	83	(1,00)	87	(1,00)	68	(1,00)	-	-	-	-
Lys-76-Thr	Thr (T)	65	(0,59)	39	(0,63)	59	(0,71)	54	(0,63)	31	(0,47)	0,60	0,489 - 0,715	0,125	-
	Lys (K)	34	(0,31)	21	(0,34)	20	(0,24)	23	(0,26)	23	(0,34)	0,29	0,241 - 0,355	0,407	-
	Mixte (K/T)	11	(0,10)	2	(0,03)	4	(0,05)	10	(0,11)	13	(0,19)	0,09	0,019 - 0,173	0,024	z > 0
	Total (N)	110	(1,00)	62	(1,00)	83	(1,00)	87	(1,00)	67	(1,00)	-	-	-	-

0,023 ; $z > 0$). Enfin, l'haplotype simple mutant **NCNI** a été observé à partir de 2006 avec un taux de prévalence de 3 %. Il a été observé une seule fois en 2008-2009 après avoir atteint un pic de 8 % en 2007 ($p = 0,002$) (**Tableau XXIX**). Certains haplotypes ont été mis en évidence au cours d'une seule année dans la population étudiée comme le double mutant **IRSI** en 2007. D'autres comme le mutant simple **NRSI** ont été observés pendant deux ans (2006 et 2007). D'autres enfin ont été observés dès 2006 ou à partir de 2007 comme **NCNI** et **ICSI** créant ainsi une diversité génétique des haplotypes du gène *pfdhfr* à partir de l'année 2006 (**Tableau XXIX**).

3.1.5.2.2 - Au niveau du gène *pfdhps*

En 2002-2003, l'haplotype **AGKAA** du gène *pfdhps* a été identifié sur 24 des 143 isolats, soit un taux de prévalence de 17 %. Cette prévalence a atteint un pic de 36,90 % en 2007, puisque l'haplotype a été isolé dans 38 des 102 isolats. Il a été également détecté dans 19 % des isolats de 2008-2009. Ces prévalences ont donc augmenté significativement (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,036$; $z > 0$). Trois phases ont été observées dans la baisse significative (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,027$; $z < 0$) de la prévalence du génotype sensible SAKAA. En 2002-2003, il a été retrouvé sur 9 des 143, soit un taux de 6 %. En 2006, avec une prévalence de 3 %, il a été porté par 2 séquences sur 67. Le taux de prévalence est resté constant de 2005 à 2007. La prévalence a encore chuté à 1,3 % en 2008-2009. Trois autres allèles dont **SGKAA**, **AAKAA**, **SGEAA** et des génotypes mixtes ont été mis en évidence. Les variations de leurs prévalences n'ont pas été significatives. L'haplotype **SGEAA** n'a été détecté qu'en 2002-2003 avec un taux de prévalence de 7 % (**Tableau XXX**).

3.1.5.2.3 - Au niveau du gène *pfprt*

Les prévalences des génotypes mixtes du gène *pfprt* ont augmenté significativement (Test de Cochran-Armitage ; $p = 0,030$; $z > 0$) avec un taux de prévalence de 9,0 % en 2002-2003 et 18 % à la fin de l'étude. Les prévalences de ces génotypes mixtes ont atteint leurs plus faibles valeurs avec 3 et 4 % en 2005 et 2006, respectivement (**Tableau XXXI**). Trois haplotypes purs ont été mis en évidence dont le triple mutant **CVIET**, le double mutant **CVMET** et l'haplotype sensible **CVMNK**. Les prévalences du triple mutant ont été les plus élevées pendant toute la durée de l'étude, avec une prévalence moyenne oscillant entre 43,80 et 65,8 %. L'haplotype sensible **CVMNK** a été observé pendant toute la durée de l'étude avec un taux de prévalence moyen de 21,30 à 33,10 %. Le double mutant n'a été détecté qu'une seule fois pendant toute l'étude, avec un taux de prévalence de 1 % en 2002-2003. Leurs variations n'ont pas été significatives (**Tableau XXXI**).

Conclusion partielle

L'analyse de la dynamique des génotypes de résistance à la SP et à la CQ a montré que les

Tableau XXIX. Dynamique des génotypes du gène *pfdhfr* à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.

Allèles <i>pfdhfr</i> N51I-C59R-S108N/T-I164L	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochrane-Armitage		
	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)			p	z > 0 ou z < 0	
Haplotypes mutants															
<u>IRNI</u>	24	(0,17)	15	(0,22)	14	(0,15)	27	(0,26)	17	(0,21)	0,20	0,148 - 0,256	0,124	-	
<u>NRNI</u>	7	(0,05)	4	(0,06)	3	(0,03)	2	(0,02)	6	(0,08)	0,04	0,018 - 0,078	0,109	-	
<u>IRSI</u>	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	6	(0,06)	0	(0,00)	0,01	-	0,023	z > 0	
<u>ICNI</u>	1	(0,01)	2	(0,03)	1	(0,01)	2	(0,02)	2	(0,03)	0,02	0,008 - 0,032	0,404	-	
<u>ICTI</u>	1	(0,01)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0,00	-	0,107	-	
<u>ICSI</u>	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(0,01)	1	(0,01)	0,004	-	0,209	-	
<u>NRSI</u>	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(0,01)	2	(0,02)	0	(0,00)	0,006	-	0,063	-	
<u>NCNI</u>	0	(0,00)	0	(0,00)	3	(0,03)	8	(0,08)	1	(0,01)	0,02	-	0,002	z > 0	
Haplotype sensible															
NCSI	49	(0,34)	19	(0,28)	14	(0,15)	21	(0,20)	17	(0,21)	0,23	0,144 - 0,328	< 0,0001	z < 0	
Génotypes mixtes	33	(0,23)	19	(0,28)	26	(0,27)	26	(0,25)	28	(0,35)	0,27	0,219 - 0,333	0,299	-	
Séquences incomplètes	28	(0,20)	8	(0,12)	34	(0,35)	8	(0,08)	8	(0,10)	0,17	-	-	-	
Total séquencé avec succès	143	(1,00)	67	(1,00)	96	(1,00)	103	(1,00)	80	(1,00)		-	-	-	

Tableau XXX. Dynamique des génotypes du gène *pfdhps* à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.

Allèles <i>pfdhps</i> S436A-A437G-K540E-A581G-A613S	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochran-Armitage		
	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)			p	z > 0 ou z < 0	
Haplotypes mutants															
SGKAA	40	(0,28)	20	(0,30)	24	(0,24)	21	(0,20)	18	(0,22)	0,24	0,197 - 0,299	0,074	-	
AGKAA	24	(0,17)	17	(0,25)	24	(0,24)	38	(0,37)	15	(0,19)	0,24	0,147- 0,341	0,036	z > 0	
AAKAA	17	(0,12)	5	(0,07)	7	(0,07)	13	(0,13)	8	(0,10)	0,09	0,064 - 0,132	0,469	-	
SGEAA	1	(0,07)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,00)	0	(0,0)	0,01	-	0,107	-	
SAKAA	9	(0,06)	2	(0,03)	3	(0,03)	3	(0,03)	1	(0,01)	0,03	0,010 - 0,054	0,027	z < 0	
Génotypes mixtes	44	(0,31)	20	(0,29)	36	(0,36)	27	(0,27)	31	(0,38)	0,32	0,264 - 0,380		0,249	
Séquences incomplètes	8	(0,06)	3	(0,04)	6	(0,06)	0	(0,0)	7	(0,09)	0,05	-	-	-	
Total séquencé avec succès	143	(1,00)	67	(1,00)	100	(1,00)	102	(1,00)	80	(1,00)		-	-	-	

Tableau XXXI. Dynamique des génotypes du gène *pfcr* à Anonkoua-kouté au cours de la période allant de 2002 à 2008.

Allèles <i>pfcr</i> C72S-A73V-M74I-N75E-K76T	2002-2003		2005		2006		2007		2008		Prévalence moyenne	IC 95 %	Test de Cochrane-Armitage		
	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)	n	(n/N)			p	z > 0 ou z < 0	
Haplotypes mutants	CVIET	63	(0,50)	39	(0,60)	59	(0,66)	54	(0,55)	31	(0,43)	0,54	0,438 - 0,658	0,281	-
	CVMET	1	(0,01)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	-	0,102	-
Haplotype sensible	CVMNK	34	(0,27)	21	(0,32)	20	(0,22)	23	(0,23)	23	(0,32)	0,27	0,213 - 0,331	0,492	-
Génotypes mixtes		12	(0,09)	2	(0,03)	4	(0,04)	10	(0,10)	13	(0,18)	0,08	0,014 - 0,162	0,030	z > 0
Séquences incomplètes		17	(0,13)	3	(0,05)	7	(0,08)	12	(0,12)	6	(0,08)	0,09	-	-	-
Total séquencé avec succès		127	(1,00)	65	(1,00)	90	(1,00)	99	(1,00)	73	(1,00)		-	-	-

prévalences des allèles clés de résistance à la SP, l'allèle *pfdhfr* Asn-108 et l'allèle *pfdhps* Gly-437, n'ont pas cessé de croître même après 2005, au contraire des allèles sensibles *pfdhfr* Ser-108 et *pfdhps* Ala-436. En moyenne, la prévalence de l'allèle *pfdhps* Gly-437 a été la plus importante de tous les allèles individuels analysés au cours de la période d'étude. Comme pour la plupart des prévalences des allèles sensibles des gènes *pfdhfr* et *pfdhps*, des baisses significatives ont été aussi mises en évidence avec l'haplotype sensible *pfdhfr*-NCSI et une variation non significative du triple mutant *pfdhfr*-**IRNI** a été observée. Il en a été de même pour le gène *pfcr*, les allèles et haplotypes de résistance à la CQ n'ont pas varié de façon significative après 2002-2003 en dépit d'un pic de 65,6 % déterminé pour le mutant **IET** en 2006. Les tendances déterminées en séparant les prévalences des allèles mutant et mixtes a permis de préciser que les prévalences des allèles purs *pfdhfr* Asn-108 et *pfdhps* Gly-437 ont augmenté significativement tandis que celles des allèles sensibles correspondant aux mêmes loci ont baissé.

3.1.6 - Complexité des infections à *Plasmodium falciparum* à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala

3.1.6.1 - Taille des allèles microsatellites pour les souches de référence

Les tailles des allèles microsatellites portés par les isolats de référence ont servi de base pour la détermination de la taille des allèles microsatellites des isolats collectés. Pour un isolat de référence donné, l'analyse de toutes les 9 microplaques a donné le même nombre de paires de bases pour un même microsatellite. Avec l'isolat de 3D7 par exemple, les allèles Poly α , P β PK2 et TA81 ont eu des tailles respectives de 149, 166 et 118 pb. Pour ces trois microsatellites, les tailles respectives de 177, 190 et 127 pb ont été fixées pour l'isolat de référence HB3 (**Tableau XXXII**).

3.1.6.2 - Diversité des allèles microsatellites par année et par site d'étude

Le microsatellite Poly- α a été le plus polymorphe avec le nombre le plus élevé d'allèles observés, c'est-à-dire, 20 allèles en 2002-2003 et 15 en 2008, ou encore 18 et 16 allèles microsatellites respectivement à Dabakala et Ayamé. L'étendue de la diversité allélique est plus grande avec le microsatellite Poly- α . Par exemple, environ le double du nombre d'allèles détectés par le microsatellite TA81 a été mis en évidence par Poly- α . Des variations sensibles du nombre d'allèles entre, d'une part 2002 et 2008, et d'autre part Dabakala et Ayamé, ont été observées avec chacun des trois microsatellites. Ces différences de nombre d'allèles n'ont pas été significatives. (**Tableau XXXIII**).

3.1.6.3 - Nombre d'allèles microsatellites par infection par année et par site d'étude

À Anonkoua-kouté, le nombre maximum d'allèles mis en évidence au cours d'une même infection

Tableau XXXII. Tailles de référence des allèles microsatellite des isolats de *P. falciparum* HB3 et 3D7.

Numéro des plaques	Contrôle positif	Poly- α	PfK2	TA81
Plaque-1	3D7	149,45	166,33	118,98
Plaque-3	3D7	149,40	166,39	118,15
Plaque-4	3D7	149,04	166,26	118,00
Plaque-5	3D7	149,55	166,42	118,07
Plaque-6	3D7	149,54	166,36	118,04
Plaque-9	3D7	149,38	166,36	118,07
Valeurs de références retenues	3D7	149,00	166,00	118,00
Plaque-1	HB3	177,27	190,21	126,94
Plaque-3	HB3	177,23	190,26	126,99
Plaque-4	HB3	177,02	190,16	126,83
Plaque-5	HB3	177,30	190,26	126,98
Plaque-6	HB3	177,30	190,00	126,93
Plaque-9	HB3	177,24	190,2	126,95
Valeurs de références retenues	HB3	177,00	190,00	127,00

Note : La seconde partie du tableau indique les valeurs de référence retenues pour les contrôles positifs HB3 et 3D7 par microsatellites. Sur la base de ces valeurs, des corrections ont été apportées aux valeurs générées grâce au logiciel Gène Mapper 4.0.

Tableau XXXIII. Taille des allèles microsatellites par année et par site d'étude.

Sites	n/N	Microsatellites	Taille min. (pb)	Taille max. (pb)	Moyenne (pb)	Nbre d'allèles	z obs.	Monte-Carlo (p)
Anonkoua-kouté (2002-2003)	131/143 (91,16 %)	Poly- α	106	197	154	20 ^{α}	-0,806 ^{α}	0,420
		TA81	109	139	120	10 ^{β}	-0,686 ^{β}	0,491
		PfPK2	146	187	164	10 ^{χ}	-0,962 ^{χ}	0,347
Anonkoua-kouté (2008)	76/80 (95 %)	Poly- α	119	221	157	15 ^{α}		
		TA81	112	133	120	8 ^{β}		
		PfPK2	157	190	165	9 ^{χ}		
Total	207/223 (92,82 %)							
Dabakala (2008-2009)	104/117 (88,89 %)	Poly- α	107	185	155	18 ^{a}	-0,019 ^{a}	0,980
		TA81	109	133	121	9 ^{b}	-0,732 ^{b}	0,474
		PfPK2	121	187	166	13 ^{c}	-0,305 ^{c}	0,768
Ayamé (2008-2009)	93/98 (94,90 %)	Poly- α	134	182	157	16 ^{a}		
		TA81	109	142	121	11 ^{b}		
		PfPK2	154	190	167	13 ^{c}		
Total	197/215 (91,12 %)							

Note : N indique le nombre d'extraits amplifié avec succès et n, le nombre d'échantillons analysés par microsatellites. Pour le test z de comparaison des prévalences, la valeur de z critique à laquelle le z observé a été comparé est de 1,960. Le seuil α de 5 % a été considéré pour la méthode de Monte-Carlo.

a baissé au cours des années d'étude. Il est passé de 5 à 3 pour poly- α , ou de 4 à 3 pour le microsatellite TA81. Le nombre moyen d'allèles par infection observé entre 2002 et 2008 dans le même site d'étude n'a pas connu de variation temporelle significative relativement aux trois microsatellites (**Tableau XXXIV**).

Au contraire, des différences significatives du nombre maximal d'allèles du nombre moyen d'allèles par infection ont été mises en évidence entre Dabakala et Ayamé. Les infections ont comporté jusqu'à 7 allèles PfkPK2 à Dabakala tandis que le nombre maximum d'allèles a été de 4 par infection à Ayamé avec le même microsatellite. La moyenne par infection a été plus importante à Dabakala qu'à Ayamé (Test de Student ; $p = 0,03$ pour poly- α ; $p < 0,0001$ pour TA81) comme l'indique le **tableau XXXIV**.

3.1.6.4 - Nombre minimum de parasites par infections multiples à *Plasmodium falciparum*

Le nombre de parasites de *P. falciparum* par infection a été considéré comme le nombre de génotypes Poly- α / PfkPK2 / TA81 détecté au cours d'une même infection. Ainsi, trois génotypes différents ont été mis en évidence dans 6 des 13 isolats portant des allèles multiples en 2002-2003 à Anonkoua-kouté. Deux génotypes différents ont été mis en évidence parmi 3 des 18 isolats de 2008 portant plusieurs des allèles microsatellites. Le nombre de génotypes a baissé de manière non significative d'une année à l'autre, passant de 3 à 2 à Anonkoua-kouté (**Tableau XXXV**).

Au cours de la période 2008-2009, le nombre de génotypes Poly- α / PfkPK2 / TA81 n'a pas varié entre Dabakala et Ayamé. Dans la première localité, 2 génotypes différents ont été mis en évidence parmi 10 isolats portant des génotypes multiples. A Ayamé, 2 génotypes Poly- α / PfkPK2 / TA81 distincts ont été retrouvés au niveau de 4 isolats portant plusieurs génotypes Poly- α / PfkPK2 / TA81 (**Tableau XXXV**).

Conclusion partielle

Cette étude a montré la diversité allélique est grande à Anonkoua-kouté (jusqu'à 20 allèles Poly- α) qui n'a pas varié significativement entre 2002 et 2008. De même la diversité allélique n'a pas varié significativement entre Dabakala et Ayamé où 18 et 16 allèles poly- α ont été détectés, respectivement. Le nombre moyen d'allèles par infection n'a pas varié à Anonkoua-kouté tandis qu'il a été plus important à Dabakala qu'à Ayamé. En outre, le nombre minimum de parasites détectés par infection est passé de 3 à 2 clones à Anonkoua-kouté. Il n'a pas varié entre Dabakala au Nord et Ayamé au Sud où il a été de 2 clones de *P. falciparum* par infection.

Tableau XXXIV. Nombre d'allèles microsatellites par infections à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala.

Sites	Période d'étude	Echantillons analysés	Microsatellites	Nombre maximal d'allèles microsat. / infection	Nombre moyen d'allèles/infection	Standard de déviation	Test de Student (p)
Anonkoua-kouté	2002-2003	50	Poly- α	5	^{α} 1,28	0,7	^{α} 0,434
			TA81	4	^{β} 1,26	0,57	^{β} 0,355
			PfPK2	3	^{δ} 1,20	0,45	^{δ} 0,324
	2008	50	Poly- α	3	^{α} 1,26	0,49	
			TA81	3	^{β} 1,22	0,51	
			PfPK2	3	^{δ} 1,16	0,42	
Dabakala	2008-2009	50	Poly- α	4	^a 1,70	0,86	^a 0,03 *
			TA81	3	^b 1,50	0,61	^b <0,0001*
			PfPK2	7	^c 1,60	0,97	^c 0,07
Ayamé	2008-2009	50	Poly- α	4	^a 1,40	0,7	
			TA81	2	^b 1,08	0,27	
			PfPK2	4	^c 1,36	0,63	

Tableau XXXV. Nombre minimum de parasites par infection multiple par année et par site d'étude.

Sites	Années	Effectifs analysés	Isolats à allèles multiples par microsat. (%)	Isolats à génotypes Poly-α - PfPK2 - TA81 multiple par infection	Nbre min. de génotypes Poly-α - PfPK2 - TA81	z obs.	p de la méthode de Monte-Carlo
Anonkoua-kouté	2002-2003	50	13 (26 %)	6 (12 %)	3	-0,490	0,862
Anonkoua-kouté	2008	50	18 (36 %)	3 (6 %)	2		
Dabakala	2008-2009	50	33 (66 %)	10 (20 %)	2	-1,071	0,343
Ayamé	2008-2009	50	19 (38 %)	4 (8 %)	2		

3.2. Discussion

Cette étude indique qu'en 2008, la fréquence de la mutation Asn-108 a été aussi importante au sein des isolats issus de porteurs sains (40,9 %) que de ceux de patients symptomatiques (52,3 %). Cette fréquence est proche de celle obtenue en 2006 à Yopougon (46,4 %) avec des isolats issus d'individus symptomatiques (Djaman *et al.*, 2010). Une proportion du même ordre, c'est-à-dire 50 % (27/54), a été déterminée en 2001 à Yopougon à Abidjan avec les mêmes types d'isolats (Djaman *et al.*, 2002). Toutes ces données traduisent une utilisation importante de la SP à Abidjan et principalement à Anonkoua-kouté depuis la période où la CQ était encore préconisée en première intention. Un tel recours à la SP pourrait s'expliquer par des pratiques thérapeutiques comme l'automédication (Dossou-Yovo *et al.*, 2001) favorisée par un accès facile à la molécule déjà disponible dans le pays bien avant 1996 (Henry *et al.*, 1996 ; 2002). Ces résultats corroborent les travaux de Tinto *et al.* (2007) qui ont associé la fréquence élevée de l'allèle Asn-108 à un usage important de la SP au Burkina Faso.

Cependant, d'autres travaux antérieurs réalisés à Abidjan sur des isolats issus d'individus asymptomatiques ont indiqué une fréquence plus faible avec 22 % (23/104) en 1998 (Djé *et al.*, 2000). Une telle augmentation de fréquence au sein des individus asymptomatiques montre la sélection de parasites portant la mutation Asn-108 à Abidjan. Ce phénomène pourrait être favorisé par l'utilisation accrue de molécules comme le TS, proche de la SP. En effet, des résistances croisées entre la pyriméthamine et le TS ont déjà été observées *in vitro* et au niveau moléculaire (Iyer *et al.*, 2001; Khalil *et al.*, 2003). Le TS est utilisé soit dans la prise en charge des fièvres liées à des affections respiratoires chez l'enfant, soit contre les infections opportunistes survenant chez les individus infectés par le VIH/SIDA (Hamel *et al.*, 2005 ; Manyando *et al.*, 2013).

Les fréquences des allèles Arg-59 et Asn-108 sont très proches dans chacune des deux catégories d'individus. Les allèles du gène *pfdhfr* portant les mutations aux codons Ser-108-Asn et Cys-59-Arg provoquent un retard de clairance parasitaire. La similarité des fréquences à Anonkoua-kouté pourrait indiquer que les parasites qui les portent ont un niveau important de résistance à la pyriméthamine. *In vitro* l'isolat est 300 fois plus résistant à la pyriméthamine que celui portant la mutation au codon Ser-108-Asn seule (Gregson et Plowe, 2005).

Les génotypes triples mutant **IRNI** (50,0 % pour les écoliers asymptomatiques et 47,7 % pour les enfants malades) et sensible NCSI (33,3 % pour les enfants asymptomatiques et 30,8 % patients symptomatiques) ont un même niveau de fréquence dans les deux groupes à Anonkoua-kouté. Par rapport à la fréquence de 17 % (20/118) rapportée par Djaman *et al.* (2002), le triple mutant a connu une augmentation au détriment de l'allèle sensible. Le recours à la SP ou à des molécules proches, c'est-à-dire, ayant les mêmes sites d'action, pourrait ainsi accroître le niveau de la

pression médicamenteuse et favoriser la sélection de parasites portant la triple mutation.

Les fréquences de 43,3 et 44,6 % de l'allèle Ala-436 ont été observées respectivement au niveau des écoliers asymptomatiques et des enfants symptomatiques. Des auteurs comme Plowe *et al.* (1997) ont montré que cet allèle associé à d'autres mutations du gène *pfdhps* pourrait contribuer à un faible niveau de résistance aux sulfamides. Cependant *in vitro*, lorsque l'allèle Ala-436 est associé à l'allèle Gly-437, il contribue à un niveau de résistance plus élevé comparé à celui provoqué par l'allèle Gly-437 seul (Gregson et Plowe, 2005). De la même manière, Vasconcelos *et al.* (2000) au Brésil ont noté que l'utilisation des sulfamides dans la prise en charge d'infections bactériennes a contribué à élever le taux des allèles Ala-436 et Gly-437. Cette proportion pourrait indiquer une utilisation intensive des sulfamides par les porteurs sains dans la prise en charge de maladies autres que le paludisme. En outre, étant donné le jeune âge des écoliers asymptomatiques, leur vulnérabilité à certaines infections bactériennes pourrait confirmer le niveau observé de la fréquence de l'allèle Ala-436 (Thera *et al.*, 2006). Au niveau des enfants symptomatiques les proportions élevées de ces deux allèles à Anonkoua-kouté pourraient résulter de l'utilisation prolongée de sulfamides dans la prise en charge de co-infections parasitaires.

Parmi les allèles clé des cinq loci du gène *pfdhps*, seule la fréquence de l'allèle Gly-437 a été significativement élevée au sein d'isolats issus de patients symptomatiques. Ces résultats sont en accord avec des auteurs comme Marks *et al.* (2005), Dokomajilar *et al.* (2006) et Tinto *et al.* (2007) qui indique par ailleurs qu'en zone d'endémicité palustre, comme Anonkoua-kouté, l'allèle Gly-437 pourrait être un bon prédicteur de la résistance à la Sulfadoxine en l'absence de l'allèle Glu-540.

Des mutations rares ont été retrouvées au niveau des patients symptomatiques aux codons Ala-613-Ser (3,1 %) et Ala-581-Gly (1,5 %). L'allèle Tyr-436 a été mis en évidence au niveau des individus asymptomatiques. En présence de Phe-436 et Gly-437, l'allèle Ser-613 accroît de 24 fois la CI50 de la Sulfadoxine des isolats qui les portent (Gregson et Plowe, 2005). Une augmentation de leurs proportion pourrait traduire un niveau très élevé de la pression médicamenteuse à la sulfadoxine à Anonkoua-kouté et une menace sérieuse au traitement préventif intermittent actuellement préconisé chez la femme enceinte (Anonyme-2, 2008). L'allèle Gly-581 indique le même niveau de résistance à la sulfadoxine que l'allèle, ce qui pourrait expliquer qu'on ne les retrouve pas ensemble Ser-613 (Brooks *et al.*, 1994; Triglia et Cowman, 1994). Les mutations aux loci Ser-436-Ala, Ala-437-Gly et Ala-613-Thr/Ser du gène *pfdhps* sont à surveiller à Anonkoua-kouté, malgré l'absence de l'allèle Glu-540. L'absence de la mutation Lys-540-Glu est en accord avec les données antérieures relatives à l'Afrique de l'Ouest (Dokomajilar *et al.*, 2006 ; Tahar *et al.*, 2007; Tinto *et al.*, 2007). La prédominance de PfdHPS S₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀

ou PfdHPS A₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀ à Anonkoua-kouté, avec des fréquences atteignant 80 % au sein des enfants symptomatiques, pourrait indiquer également un niveau préoccupant de la résistance, mais faible comparé à celui déterminé par d'autres auteurs en Afrique de l'Est (Nzila *et al.* 2002 ; Dokomajilar *et al.*, 2006 ; Sutherland *et al.*, 2009). Ceci pourrait aussi confirmer l'origine Ouest africaine des isolats collectés. En effet une des trois origines des lignées de parasites portant les génotypes PfdHPS A₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀ ou PfdHPS S₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀ est Ouest africaine, notamment celle de la lignée AGK/SGK 2 comme cela a été souligné ailleurs (Anderson, 2009 ; Pearce *et al.*, 2009).

En outre, cette étude a montré que les mutations aux loci Ser-108-Thr et Val-16-Ala associées à la résistance au proguanil n'ont pas été observées à Anonkoua-kouté. Ces résultats sont en conformité avec les résultats d'études similaires réalisées au Burkina Faso et au Mali (Dokomajilar *et al.*, 2006 ; Tahar *et al.*, 2007) puisqu'en Afrique de l'Ouest, le proguanil n'est pas préconisé dans la prise en charge du paludisme.

L'allèle quintuple mutant de la combinaison *pf dhps*/*pf dhfr* dont est absent l'allèle *pf dhps* Glu-540, c'est-à-dire le génotype IRNI/AGKAA, a été prédominant dans la population d'étude avec une fréquence de 27,3 % pour les symptomatiques et 33,8 % au sein des participants symptomatiques. Nzila *et al.* (2002) indiquent plutôt la prédominance du génotype IRNI/AGEAA en Afrique de l'Est. A Anonkoua-kouté, le niveau de la pression à la SP pourrait avoir favorisé la sélection de parasites des mutations de la combinaison *pf dhps*/*pf dhfr* dont est absente la mutation *pf dhps* Glu-540. En effet, cette dernière mutation surviendrait avec un fardeau génétique que leurs performances du moment sont incapables de supporter. L'association des allèles *pf dhps* Glu-540 et *pf dhfr* Arg-59 n'a pu être observée à Anonkoua-kouté alors qu'au Malawi et en Ouganda, ils ont été considérés comme de bons marqueurs pour prédire les échecs thérapeutiques à la SP (Kublin *et al.*, 2002). Une des raisons de cette différence pourrait être la quasi omniprésence des allèles résistants du gène *pf dhfr* dans les localités d'Afrique de l'Est.

La mutation Ser-72 du gène *pf crt* a elle aussi été absente de la population d'étude. Cependant, elle est retrouvée en Amérique du Sud et en Asie portée par les isolats CQR, en association avec la mutation clé Lys-76-Thr (Sutherland *et al.*, 2007 ; Bharti *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2011). L'allèle Thr-76 a été associé aux allèles Ile-74 et Glu-75 dans plus de deux tiers des isolats des deux catégories d'individus, soit 69 % d'isolats. Cette fréquence élevée des isolats portant la triple mutation pourrait s'expliquer par l'amélioration de leurs performances génétiques avec la pression de sélection à la CQ. En effet, lorsque la pression médicamenteuse est faible, la résistance à la CQ s'accompagne d'une réduction des performances génétiques des parasites résistants par rapport aux parasites de type sensible. Cela signifie qu'au cours d'infections non traitées, ils sont éliminés

en faveur des parasites sensibles (Ord *et al.*, 2007). L'ingestion de la CQ améliore leur performance génétique et les rend détectables au niveau des individus hôtes (Gadalla *et al.*, 2010). Lorsque la consommation de la CQ devient abusive, comme l'ont rapporté Djaman *et al.* (2004a) et devient persistante, comme relevé ailleurs (Ouattara *et al.*, 2010 ; Djaman *et al.*, 2010 ; Frosh *et al.*, 2011), les parasites portant la triple mutation Ile-74/Glu-75/Thr-76 est observée. Ceux-ci sont sélectionnés par la pression de la CQ au détriment des parasites sensibles qui tendent à être éliminés à cause de la perte de leur performance génétique.

Les génotypes mixtes ont été plus fréquents parmi les isolats d'écoliers asymptomatiques. Cela pourrait être dû à l'âge des individus portant ces isolats puisque chez les enfants de moins de 15 ans les infections multiples sont nécessaires à l'établissement d'une l'immunité partielle à l'âge adulte comme le rapportent Al-Yaman *et al.* (1997) et Smith *et al.* (1999).

L'urbanisation, les activités agro-économiques et les effets des mouvements migratoires des populations humaines vers Samo sont trois des facteurs qui pourraient expliquer la grande variabilité génétique observée dans cette localité rurale. Le niveau d'urbanisation entre milieu rural et milieu urbain affecte la répartition des génotypes de *P. falciparum*. Une telle différence a déjà été observée avec le polymorphisme antigénique des marqueurs *msp2* où la sous-famille d'allèles FC27 a été majoritairement représentée en milieu rural et la sous-famille 3D7 plus fréquente en zone urbaine (Soulama *et al.*, 2009). Les déterminismes de cette répartition demeurent encore inconnus. Cependant, à cause de l'exode rurale qu'elle engendre, l'urbanisation influence la transmission du parasite dans les zones urbaines (Robert *et al.*, 2003 ; Keiser *et al.*, 2004 ; Bogreau *et al.*, 2006). Elle conduit à une baisse du niveau d'endémicité d'où une réduction de la variabilité génétique plus marquée en zone urbaine.

Cette différence pourrait se justifier aussi par l'intensification des activités agroéconomiques dans les sites d'étude, comme observé en zone rurale à Samo jusqu'au milieu des années 2000. Bonoua et ses environs se caractérisent par la production d'ananas avec de vastes étendues de champs aux alentours de Samo (Willems, 2006 ; Colin *et al.*, 2007). Or Asenso-Okyere *et al.* (2009) ont montré que les fourrés, c'est-à-dire l'aisselle des feuilles, formés par la couverture végétale sont favorables à la reproduction anophélienne. Ce phénomène observé chez le maïs pourrait s'étendre à la culture de l'ananas ou à d'autres cultures de rente comme le palmier à huile (Kebede *et al.*, 2005). Toutes ces cultures présentes à Samo pourraient être ainsi des sources potentielles de reproductions des anophèles (Asenso-Okyere *et al.*, 2009). Les pratiques agricoles qui augmentent la densité anophélienne pourraient entraîner aussi une augmentation du risque de transmission du paludisme dans la population. Ainsi, la transmission du paludisme pourrait s'intensifier dans les zones rurales si des activités agricoles similaires sont tenues à proximité des

villages ou alors si les acteurs de ces activités sont exposés à la piqûre des anophèles vecteurs de *P. falciparum* (Tsumori *et al.*, 2011).

La présence de l'industrie d'ananas a attiré des forces vives vers Samo (Willems, 2006 ; Colin *et al.*, 2007). Du fait de mouvements migratoires vers Samo, les parasites pourraient présenter différents assortiments génétiques, et expliquer le polymorphisme des marqueurs moléculaires associés à la résistance à la SP et à la CQ au sein des populations humaines de cette zone. L'étendue de la diversité génétique des parasites de *P. falciparum* pourrait résulter d'interactions entre l'exode vers des pôles à l'exemple de Samo et le faciès épidémiologique local (Soulama *et al.*, 2009). Les données obtenues montrent que la diversité génétique et la résistance aux antipaludiques ne sont pas toujours plus intenses en zone urbaine comme l'ont rapporté Bogreau *et al.* (2006) et Meissner *et al.* (2008).

La plupart des génotypes du gène *pf dhps* détectés à Samo ont une aire de propagation essentiellement Ouest africaine. L'hétérogénéité des populations venues à Samo pourrait expliquer la variabilité génétique qui y a été observée. Les résultats obtenus vont dans le sens de ceux de Pearce *et al.* (2009) qui ont souligné que les génotypes PfDHPS A₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀ et PfDHPS Ser₄₃₆G₄₃₇K₅₄₀ sont communément rencontrés en Afrique de l'Ouest. Ils sont aussi en accord avec ceux de Sutherland *et al.* (2009) et Alam *et al.* (2011) qui précisent que les génotypes AGKAA et AGKAS ont été principalement observés au sein d'isolats provenant du Ghana voisin ou du Nigéria. Ces isolats ont été détectés à Samo dans les proportions respectives de 26,7 et 3,3 %.

Les génotypes FAKAS et YAKAS, retrouvés à Samo ont déjà été signalés à Abidjan par Djaman *et al.* (2010). Au Sud du Ghana, le génotype FAKAS a été observé à Bekwai dans une proportion de 8,3 % tandis que YAKAS a été détecté à Cape Coast à 2,9 % par Alam *et al.* (2011). Leurs implications dans la résistance à la SP n'ont pas encore été clairement élucidées. Des tests de chimiosensibilité *in vitro* pourraient être menés avec les isolats portant ces allèles. En outre, l'analyse du polymorphisme des régions flanquant le gène *pf dhfr* pourrait confirmer l'origine géographique des lignées génétiques auxquelles les isolats résistants issus de Samo appartiennent comme l'ont fait Roper *et al.* (2004) et Ariey *et al.* (2006) pour les triples mutant IRNI et CVIET, respectivement.

Le niveau de fréquence a été préoccupant à Bonoua avec 100 % de fréquence pour l'allèle Gly-437 du gène *pf dhps* et pour le génotype CVIET du gène *pf crt*. Cela a fait penser à une fixation de ces allèles à Bonoua. Dans cette localité, le triple mutant CVIET a été l'unique génotype de *pf crt* observé avec une absence totale de l'allèle sauvage CVMNK. Ces résultats répondent aux deux premières conditions énumérées par Khim *et al.* (2005) et McCollum *et al.* (2007) pour la fixation d'un allèle. Le niveau du flux migratoire vers Bonoua n'a pu être mesuré. L'existence d'un tel

flux est contraire à la troisième condition énumérée par ces deux auteurs. On ne peut conclure avec certitude à une fixation de l'allèle **CVIET**.

Les résultats indiquent aussi un niveau plus élevé des marqueurs de résistance à la CQ à Bonoua en 2005. Déjà en 2004 à Abidjan, en utilisant les tests de chimiosensibilité *in vitro*, Touré *et al.* (2008) ont rapporté un niveau similaire de CQR avec une CI50 moyenne de 224,78 nM contre 47,46 nM pour les isolats sensibles. Kublin *et al.* (2003) et Ariei *et al.* (2006) rapportent que dans un tel environnement de forte pression médicamenteuse, les parasites résistants à la CQ persistent grâce à l'amélioration de leurs performances génétiques. En outre, la CQ a été remplacée par l'AQ en 2003, alors que Ferdig *et al.* (2004) rapportent que cette molécule est une autre aminoquinoléine contre laquelle *P. falciparum* développe des résistances croisées. Elle a donc contribué à la persistance de la résistance à la CQ. Selon Mackinnon et Marsh (2010), les isolats CQR ont l'avantage de se reproduire sans interruption dans un tel contexte, ce qui explique leur importante transmissibilité perçue deux ans après le retrait officiel de la CQ.

A Anonkoua-kouté, Bonoua et Samo, les données révèlent la quasi absence des génotypes sensibles respectifs PfdHPS SAKAA et PfcRT CVMNK et le maintien du génotype PfdHFR NCSI malgré le niveau de la pression de sélection dans ces trois localités. Dans un tel contexte de pression médicamenteuse importante, les parasites portant les génotypes sensibles sont soit éliminés à cause de leur faible performance génétique ; soit ils sont maintenus grâce à une mutation de compensation (Andersson, 2006). Ce phénomène de compensation pourrait exister au niveau du gène *pfdfhr* et expliquer la persistance du génotype sensible NCSI dans la population à des proportions non significativement différentes de celles du triple mutant **IRNI**.

Les marqueurs individuels de résistance à la pyriméthamine, c'est-à-dire les allèles Asn-108, Arg-59 et Ile-51, ont été prédominant au sein des isolats provenant d'Anonkoua-kouté et Ayamé. Les taux de prévalence des allèles sensibles Cys-59 et Ser-108 ont été plus importants à Anonkoua-kouté et Dabakala, tandis que celles des allèles mixtes Cys/Arg-59 et Ser/Asn/Thr-108 n'ont été prédominants qu'à Dabakala. Au niveau du gène *pfdhps*, seules les fréquences du marqueur individuel Gly-437 ont été prédominantes parmi les isolats provenant d'Anonkoua-kouté et Ayamé. Les allèles sensibles ont été prédominants soit à Anonkoua-kouté seul pour l'allèle Ser-436, soit à Anonkoua-kouté et Ayamé pour l'allèle Ala-437. Les allèles mixtes Ser/Ala-436 et Ala/Gly-437 ont leurs plus forts taux à Dabakala. Les fréquences des marqueurs individuels de résistance à la CQ ont été plus élevées au sein des isolats issus d'Anonkoua-kouté et Ayamé. Les essais cliniques réalisés entre la fin des années 90 et la première moitié des années 2000, avant l'abandon de la SP et de la CQ, indiquent aussi une répartition géographique des taux d'échecs thérapeutiques à la SP et à la CQ. A Aboisso par exemple, non loin d'Ayamé, un taux d'échec de

63,2 % a été rapporté par Menan *et al.* (2007). Les taux de prévalence de 37 % et de 21 % ont été rapportés respectivement à Agou par des auteurs comme Yavo *et al.* (2002) et à Abié par Adjetei *et al.* (2005). A Abidjan et plus précisément à Yopougon, un taux de 33 % d'échecs thérapeutiques à la CQ a été déterminé (Djaman *et al.*, 2001, 2004a). Dans le Sud-ouest à San-Pedro, ce taux est passé à 19 % (Kassi *et al.*, 2004). Des taux plus modérés ont été déterminés à l'Est avec 12,2 % d'échecs thérapeutiques, soit 30 échecs sur 247 individus (Adoubryn *et al.*, 2004). Dans la même période, ces taux ont atteint 26,9 % (Adou-Bryn *et al.*, 2002) dans une zone comprenant Yamoussoukro, Bouaké et Kossou au Centre de la Côte d'Ivoire. Dans les forêts du grand Ouest, des travaux de Henry *et al.* (2002) ont indiqué un taux de 43 % obtenu en 2000. Les taux d'échec semblent avoir varié de façon décroissante d'une part du Sud-est vers le Sud-ouest et d'autre part, du Sud vers le Nord du pays.

Des facteurs explicatifs liés à l'hôte comme le niveau de prémunition, la pharmacocinétique de la molécule à l'étude, la constitution génétique des populations humaines, l'alimentation des participants, sont à prendre en compte dans les causes de la variation des réponses thérapeutiques (Rogier *et al.*, 2009 ; Rovira-Graells *et al.*, 2012). D'autres facteurs liés de façon plus intrinsèque aux parasites et ayant un effet direct sur les prévalences des marqueurs moléculaires pourraient aussi expliquer les différences observées dans la répartition des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ entre Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala. Ce sont par exemple la pression médicamenteuse exercée par une utilisation intensive de la SP et de la CQ (Nzeyimana *et al.*, 2006 ; Enosse *et al.*, 2008).

La variabilité de l'épidémiologie du paludisme pourrait aussi expliquer cette différence. Elle est liée aux faciès épidémiologiques et phytogéographiques selon qu'ils favorisent et maintiennent une importante pression anophélienne comme l'ont indiqué Mouchet *et al.* (2004) et Raso *et al.* (2012). Dans un environnement où la densité anophélienne est forte et dans lequel la pression médicamenteuse aux molécules usuelles est élevée, le risque est grand que les piqûres infectantes transmettent les parasites portant les mutations de résistance (Koudou *et al.*, 2010). Ces facteurs ont été observés au Sud et à l'Ouest du pays comme l'attestent Adja *et al.* (2011) qui ont mis en évidence l'implication de trois vecteurs *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. nili* dans la transmission pérenne du paludisme dans ces régions.

Cependant, cette répartition des échecs thérapeutiques à la SP et CQ n'est pas superposable à ce qui a été observé au cours de l'étude à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala. Des disparités géographiques significatives ont été mises en évidence dans la répartition des fréquences des mutants PfDHFR **IRNI**, PfDHPS **SGKAA** et PfCRT **CVIET**. Les fréquences de ces génotypes ont tous été plus importantes à Anonkoua-kouté (23,61 ; 24,66 et 46,27 %) et à Ayamé (22,35 ; 17,05

et 43,33 %). Au contraire, les fréquences de ces mêmes génotypes ont été plus faibles à Dabakala avec 7,69 ; 10,58 et 18,35 %, respectivement. L'haplotype sensible CVMNK y a été très prédominant, avec une fréquence (60,55 %) plus élevée qu'à Anonkoua-kouté (34,33 %) et Ayamé (36,67 %). La fréquence du triple mutants PfDHFR **IRNI** déterminée pour Dabakala (7,69 %) est proches des 7,3 % rapportés à Adzopé. Les fréquences rapportées dans cette dernière localité pour le simple mutant NC**NI** (4,9 %), les doubles mutant **ICNI** (9,7 %) et NR**NI** (13,4 %) sont souvent plus importantes que celles des localités d'Anonkoua-kouté, Ayamé voire de Dabakala (Ouattara *et al.*, 2010). La fréquence de 65 % de l'allèle *pfprt* Thr-76 obtenu à Anonkoua-kouté est similaire du taux de 65,3 % déterminés à Abidjan en 2006 par Djaman *et al.* (2010). La fréquence de 62 % de cet allèle à Ayamé est semblable à celui de 62,2 % rapporté à Adzopé en 2007 par Ouattara *et al.* (2010). Cependant, les fréquences du triple mutant CV**IET** dans les localités d'Anonkoua-kouté (46,27 %) et Ayamé (43,33 %) sont plus faibles que celle de 57,3 % (47/82) rapportée à Adzopé en 2007. En outre, le simple mutant CVMN**T** mis en évidence à Adzopé en 2007 avec une fréquence de 4,9 % (4/82) (Ouattara *et al.*, 2010) n'a été retrouvé ni Anonkoua-kouté ni à Ayamé.

Ainsi à environ 84 km au Nord-est d'Abidjan, les marqueurs de résistance à la pyriméthamine ont une fréquence aussi faible qu'à Dabakala tandis que ceux relatifs à la résistance à la CQ sont plus importants au Sud à Anonkoua-kouté en zone périurbaine et à Ayamé en zone rurale. La sélection des mutations suit un mode progressif partant toujours de la mutation clé Asn-108 (Gregson *et Plowe*, 2005 ; Plowe, 2009). Le nombre de mutations secondaires additionnelles varie selon le niveau de la pression à la pyriméthamine de la zone d'étude, ainsi que de l'aptitude à s'adapter des parasites porteurs de mutations (Andersson, 2006). Dans les deux localités du Sud, le niveau de la pression à la SP est favorable à la sélection des parasites portant le triple mutant **IRNI**. A Adzopé et à Dabakala, ce niveau n'a pas été assez intense pour favoriser la sélection d'au-moins une mutation additionnelle en plus de l'allèle Asn-108.

La proportion élevée d'isolats portant l'allèle PfCRT CVMNK (60,55 %) à Dabakala par rapport à Anonkoua-kouté et Ayamé corroborent les résultats d'une étude ayant évalué l'efficacité thérapeutique de la chloroquine au Nord de la Côte d'Ivoire à Fapaha (Korhogo) et Petionara (Niakara) en 1997 chez des enfants symptomatiques âgés de 6 mois à 7 ans. Aucun échec thérapeutique n'a été noté parmi les enfants de Fapaha tandis que 11,1 % d'échec ont été noté à Petionara. Selon l'auteur de l'étude, cette différence s'explique par l'absence de centre de santé dans le premier village, où le recours à la biomédecine traditionnelle est exclusif. A Petionara, la présence d'un centre de santé facilite l'accès à la chloroquine et accroît le risque d'automédication (Prao K., 2001).

Les faibles taux de prévalence des allèles PfCRT CV**IET** (18,35 %) et PfDHPS **SGKAA**

(10,58%) pourraient indiquer une faible pression à la CQ et à la SP à Dabakala comparée à celle obtenue à Anonkoua-kouté et Ayamé au Sud. Ce faible niveau de pression pourrait résulter de la faible fréquentation des infrastructures de soin et de santé. En effet, Franckel *et al.* (2008), Kizito *et al.* (2012) et Kyabayinze *et al.* (2012) rapportent que la fréquentation des structures de soin en Afrique subsaharienne varie selon les niveaux socio-économiques et l'alphabétisme des malades. Ils ont identifié plusieurs facteurs décisifs dont le faible coût des services de soin, la proximité de la source de prise en charge, la croyance que la structure de soin ou les médicaments qui y sont procurés peuvent guérir le mal dont ils souffrent, la qualité des services, les heures d'ouverture et le temps d'attente.

L'absence de ces facteurs décisifs accroît le risque d'automédication et contribue à entretenir le primat de la médecine traditionnelle sur la médecine moderne. Cette perception est en accord avec celle de Nzeyimana *et al.* (2006) et Franckel *et al.* (2008) qui énoncent que cette absence peut même contribuer à générer une attitude de défiance vis-à-vis des traitements de la biomédecine et considérer souvent les structures de soins comme le dernier recours d'un parcours thérapeutique complexe. Au niveau culturel par exemple, les pesanteurs de la tradition peuvent pousser les populations vers des solutions dites traditionnelles. Dans ce sens, Yangni-Angaté (2005) précise que les itinéraires thérapeutiques des malades trouvent leur justification dans un processus de guérison soumis à la logique de l'origine surnaturelle de la maladie. Selon lui, il existe dans la conscience de l'africain la notion de maladie contingente de cause occulte et la notion de maladie autonome ou maladie naturelle. Dans certaines conditions, les maladies autonomes deviennent contingentes, autrement dit des lésions provoquées de façon occulte.

Une typologie similaire décrite par Nzeyimana *et al.* (2006) est retrouvée dans la nosologie des maladies infantiles en milieu rural en Côte d'Ivoire dont le paludisme. Ceci rend souvent difficile la prise en charge rapide du paludisme simple comme l'indique Doannio *et al.* (2006). Ainsi, tant que l'africain restera attaché à sa culture et la vivra sous toutes ses formes, singulièrement sur le plan médicale, le problème de primat à accorder à la médecine traditionnelle africaine sur la médecine moderne subsistera toujours (Yangni-Angaté, 2005). Dans un tel contexte, la faible pression médicamenteuse indiquée par les fréquences observées à Dabakala pourrait s'expliquer soit par un meilleur suivi des prescriptions médicales comme l'indique Doannio *et al.* (2006), soit par la perte des caractères sélectionnés *de novo* par le parasite avec le décès de son hôte, comme le montrent White *et al.* (2009) et Mackinnon et Marsh (2010).

La complexité des itinéraires thérapeutiques concerne aussi la partie Sud du pays puisque l'ensemble de la population a une pratique thérapeutique similaire comme le prouvent les travaux de Dossou-Yovo *et al.* (2001), Yangni-Angaté (2005) et Doannio *et al.* (2006). Cependant, cette complexité y est moins perceptible. Du fait d'une importante densité de la population, les

infrastructures de soin sont plus concentrées au Sud et surtout dans les grandes villes comme Abidjan. Cette idée est en accord avec les résultats d'une enquête de l'OMS qui révèle que le ratio médecin par habitant de 1/9000 en 2000 est passé à 1/5695 en 2007 en Côte d'Ivoire. Cet effectif est inégalement réparti sur le territoire puisque les grandes villes, et particulièrement Abidjan et ses environs, regroupent 60 % du personnel de soin ([Anonyme-3, 2011](#)).

Les fortes proportions des allèles résistants observées à Anonkoua-kouté et Ayamé au Sud pourraient résulter de l'utilisation abusive des antipaludiques usuels surtout dans un contexte de traitement présomptif du paludisme. Min ([2012](#)) indique que les couches les plus défavorisées de la population préfèrent se tourner vers les marchés parallèles pour se procurer la SP et la CQ qui demeurent des molécules antipaludiques bon marché et efficaces. Selon [Granado et al. \(2009 et 2011\)](#) et [Orostegui et al. \(2011\)](#), les marchés parallèles sont nombreux dans les quartiers précaires retrouvés dans les grandes villes comme Abidjan ou San-Pedro en Côte d'Ivoire. Près de 45 points de vente illicites de produits pharmaceutiques y compris divers antipaludiques ont été dénombrés dans ce type de quartiers à Abidjan en 2005 ([Granado et al. 2011](#)). L'AQ n'y était pas disponible, mais la SP et la CQ y ont été vendues en doses uniques et sans emballage ([Granado et al., 2011](#)). Le faible pouvoir d'achat des populations est à l'origine du recours aux détaillants non officiels ([Kizito et al. 2012](#)). Elles ne peuvent pas se procurer les CTA recommandées dans la prise en charge du paludisme.

La répartition géographique des fréquences des marqueurs associés à la résistance à la SP et à la CQ observée est l'aboutissement d'une évolution moléculaire de *P. falciparum* soumis aux niveaux locaux de la pression médicamenteuse comme au Brésil et au Malawi ([Kublin et al., 2003](#) ; [Gama et al., 2009](#)). Des lignées génétiques locales ou régionales du double mutant **NRNI** peuvent évoluer vers le triple mutant **IRNI** comme l'indique [Valderramos et al. \(2010\)](#).

Les résultats obtenus à Anonkoua-kouté indiquent que le retrait de la SP en traitement de première intention en 2005 en Côte d'Ivoire a été suivi d'une augmentation de la fréquence des allèles individuels de résistance associé aux gènes *pfdfhr* et *pfdhps*. [Malisa et al. \(2010\)](#) ont montré une augmentation significative des fréquences de ces mêmes marqueurs en Tanzanie une année après l'adoption de la SP en traitement de première intention après des années d'utilisation en seconde intention. La fréquence du triple mutant PfdHFR **IRNI** a augmenté de 37 à 63 % et celle du double mutant PfdHPS **SGEAA** de 300 % ([Malisa et al., 2010](#)). Une dynamique contraire a été décrite au Mozambique par [Enosse et al. \(2008\)](#) au cours de laquelle les fréquences des marqueurs de résistance à la SP ont commencé à décroître de façon significative après le retrait effectif de cet antipaludique en 2002. Le niveau de la résistance a décliné avec la baisse de la pression de sélection qui a suivi le retrait effectif de la SP ; les parasites portant les allèles sensibles ont été favorisés au détriment des isolats résistants ([Enosse et al., 2008](#)).

A Anonkoua-kouté, ces observations s'expliquent par l'utilisation continue de la SP même après son retrait officiel. Les coûts des CTA adoptés en 2005 ont été excessifs pour une population déjà accoutumée aux médicaments bon marché comme la SP et de la CQ utilisés depuis plusieurs décennies (Penali *et al.*, 1990 ; Henry *et al.*, 2002). La lenteur de la fourniture des CTA aux formations sanitaires et dans les infrastructures de soin pourrait justifier les observations faites à Anonkoua-kouté.

A Anonkoua-kouté, les allèles de faibles prévalences PfdHFR Thr-108, PfdHPS Glu-540 et PfcRT Ser-72 ont été déterminés seulement en 2002-2003. Les prévalences des marqueurs Thr-76, Glu-75 et Ile-74 n'ont pas varié significativement. Les allèles mixtes ont pour effet de modifier les prévalences des allèles purs considérés comme ayant plus d'intérêt biologique selon Dokomajilar *et al.* (2006). L'analyse de la dynamique des haplotypes de résistance à la SP et à la CQ a montré une baisse significative des taux de prévalence de l'haplotype sensible PfdHFR NCSI et une variation non significative de la prévalence du triple mutant PfdHFR **IRNI** de 2002 à 2008. Les taux de prévalence de l'haplotype sensible PfdHPS SAKAA ont diminué de façon significative alors que celles du double mutant PfdHPS **AGKAA** ont augmenté au cours de l'étude. Enfin, une variation non significative des taux de prévalence des haplotypes résistants du gène *pfcr* a été mise en évidence de 2002-2003 jusqu'à la fin de l'étude. La pression de sélection due à la SP a contribué à la persistance du triple mutant **IRNI** et du double mutant **AGKAA**. Cette pression de sélection pourrait avoir été favorisée par l'accessibilité continue à cette monothérapie malgré qu'elle soit exclusivement préconisée en prophylaxie de la femme enceinte par le PNL (Anonyme-2, 2008).

L'usage d'antifolates potentiellement efficaces et bon marché pourrait accroître cette pression. Le TS utilisé en Côte d'Ivoire depuis plus d'une décennie a fait l'objet d'essais cliniques indiquant une baisse de l'infection palustre parmi les adultes atteints de VIH-1 et sous une prophylaxie à cette combinaison thérapeutique (Anglar *et al.*, 1999 ; Wiktor *et al.*, 1999). Mermin *et al.* (2005) avancent qu'en Ouganda la prophylaxie par le TS pourrait être associée à l'augmentation du taux de la prévalence des mutations *pfdhfr* et *pfdhps* conférant la résistance au Sulfaméthoxazole. Au Malawi, les travaux de van Oosterhout *et al.* (2011) montrent que le TS sélectionne des parasites très résistants en augmentant le risque d'échec du traitement à la SP au niveau des individus et le taux de paludisme résistant à l'antifolate dans la population.

Cette association thérapeutique étant aussi préconisée dans des infections comme la Salmonellose, la Toxoplasmose (Laufer and Plowe, 2006), voire au cours d'infections respiratoires chez les enfants, elle pourrait être utilisée par des individus asymptomatiques. Lors de l'infection des individus asymptomatiques, les parasites de *P. falciparum* se trouvent au contact de doses sub-thérapeutique de TS, favorisant ainsi la sélection de parasites résistants. L'utilisation accrue des

folates comme le TS et la pyriméthamine, pourraient donc exercer une pression de sélection sur les allèles *pfdhfr* conférant la résistance aux antifolates et aux sulfamines. Walliker *et al.* (2005) rapportent que les parasites porteurs d'allèles résistants subissent un fardeau d'adaptation que leur performance permet de surmonter avec le niveau croissant de la pression médicamenteuse à ces deux associations thérapeutiques.

Les isolats ayant un niveau élevé de résistance peuvent être sélectionnés sans compromettre leurs capacités d'adaptation et de reproduction globales (Andersson *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 2010). McCollum *et al.* (2008) précisent qu'en générale chez les procaryotes, les isolats portant de telles mutations persistent grâce à un phénomène de compensation génétique au cours duquel la performance est améliorée par une mutation supplémentaire sans perdre la mutation à l'origine de la résistance. Avec *P. falciparum* cependant, les niveaux de résistance pourraient persister plutôt grâce à la liaison génétique ou à la co-sélection de marqueurs (McCollum *et al.*, 2008). Par exemple, Humphreys *et al.* (2007) ont montré que l'AL et l'AQ exercent une sélection directionnelle opposée sur le gène *pfmdr1* de *P. falciparum*. Il en est de même pour la mutation Thr-76 du gène *pfprt* qui pourrait accroître la sensibilité du parasite à la lumefantrine (Sisowath *et al.*, 2009). Lekana-Douki *et al.* (2011) ont montré qu'il y a un bénéfice à avoir des parasites de *Plasmodium falciparum* portant l'allèle Thr-76. Remplacer la CQ par l'AQ dès 2003 et le retrait partiel de la CQ semblent ne pas avoir permis une réduction importante du niveau de la résistance à cette molécule dans le village d'Anonkoua-kouté. Les performances adaptatives des parasites portant les allèles résistants se sont améliorées favorisant leur maintien au sein de la population de l'étude.

Le double mutant **IRSI** a été observé uniquement en 2007 à Anonkoua-kouté. Cette présence inopinée pourrait résulter de l'utilisation de la TS en prophylaxie antipalustre chez les sujets atteints de VIH/SIDA vers la fin de l'année 2004 avec l'installation de l'ONG Aconda VS au sein de la FSUCOM. Ce double mutant a été mis en évidence pour la première fois à la suite de la prise en charge du paludisme simple à *P. falciparum* avec le TS comme le rapportent Gregson et Plowe (2005). En effet, Warhurst (2002) indique que l'allèle Ser-108 pourrait être l'allèle clé impliqué dans la résistance au Triméthoprim tout autant que l'allèle Asn-108 l'est pour la pyriméthamine. Toutefois, l'apparition brève du double mutant **IRSI** pourrait aussi suggérer qu'il a été porté par des migrants de passage dans le village en 2007.

Les taux de prévalence des marqueurs clés sont restés presque constants depuis le retrait officiel de 2003. Ces données sont en accord avec les résultats des travaux d'Efunshile *et al.* (2011) réalisés au Nigéria et de Tinto *et al.* (2008) au Burkina Faso. Ces travaux indiquent qu'il n'y a pas eu de diminution significative du taux de prévalence du marqueur Thr-76 en 2006-2007. Plusieurs explications pourraient justifier ces observations.

Malgré l'arrêté ministériel tardif pris en 2007 pour le retrait effectif de la CQ du marché ivoirien, la molécule est restée accessible et considérée comme recours pour les couches les plus défavorisées de la population comme le soulignent Granado *et al.* (2009) et Orostegui *et al.* (2011). Frosh *et al.* (2011) indiquent que cette pratique semble être généralisée dans la sous-région Ouest africaine et pourrait être à l'origine du maintien de la pression élevée à la molécule dans la sous-région.

Une autre explication se situe au niveau de l'évolution moléculaire des parasites CQR. Zur Wiesch *et al.* (2011) expliquent que la résistance à la CQ peut survenir avec ou sans la perte subséquente de la performance des parasites résistants. Si elle survient avec une perte subséquente de la performance, ses effets sur les parasites sont de deux ordres. Premièrement, elle affecte négativement les capacités de reproduction et d'adaptation du parasite. Les parasites résistants développent alors un mécanisme compensatoire leur permettant de croître jusqu'à être fixés dans la population étudiée. Les mutations compensatoires augmentent l'aptitude d'un organisme porteur d'une mutation de résistance aux médicaments, mais sont préjudiciables à un organisme de type sauvage, ou sont neutres. Elles peuvent réduire la performance du parasite résistant en l'absence ou en présence de médicaments ou dans les deux situations. Deuxièmement, aucune mutation compensatoire n'est développée, les parasites sensibles émergent en l'absence de pression de la CQ. Laufer et Plowe (2004) ajoutent que s'ils ne perdent pas leurs performances, les parasites résistants continuent de se répandre même après le retrait de la CQ. Cette dernière situation a été mise en évidence après le retrait de la SP et de la CQ au Malawi et au Brésil par Kublin *et al.* (2003) et Gama, *et al.* (2009), respectivement.

En Côte d'Ivoire, le retrait de la CQ a été partiel jusqu'en 2007. Contrairement au contexte malawite où la SP a été préconisée à la place de la CQ dès 1993, la CQ a été remplacée en première intention par l'AQ. C'est une autre aminoquinoléine encore utilisée sous la forme de combinaison thérapeutique avec l'Artesunate dans l'association ASAQ. Des mécanismes de résistances croisées entre CQ et AQ déjà rapportés par Ginsburg *et al.* (1998) et Ochong *et al.* (2003) pourraient expliquer le niveau élevé de la pression de sélection aux aminoquinoléines depuis son retrait officiel en 2003.

Selon zur Wiesch *et al.* (2011), le retrait partiel d'une molécule et les phénomènes de résistance croisée aux molécules encore utilisées, sont deux des facteurs qui réduisent les aptitudes des parasites résistants sans menacer la résistance elle-même, d'où la persistance des micropathogènes résistants souvent même en effectif restreint. Ces mécanismes expliquent aussi la persistance des parasites résistants à la CQ à Anonkoua-kouté au détriment des parasites sensibles. Les taux de prévalences presque égales des allèles Ile-74, Glu-75 et Thr-76 justifient les taux moyens élevés (43,8 -65,8 %) de l'haplotype triple mutant CV**IET** qui confirment la persistance de la résistance à

la CQ.

L'utilisation de trois marqueurs a permis de mettre en évidence un nombre maximum de 7 allèles par infection chez les enfants de 6 à 59 mois à Dabakala. L'utilisation de plusieurs marqueurs moléculaires a l'avantage de mettre en évidence un nombre élevé de clones comme l'indiquent Mueller *et al.* (2012) tout en rappelant les difficultés statistiques qui peuvent exister avec une telle approche. En outre, ces mêmes auteurs notent que le nombre de clones mis en évidence est fonction du seuil de détectabilité de la méthode utilisée et du phénomène de séquestration au cours duquel certains parasites infectant les organes profonds ne peuvent être mis en évidence. Le nombre d'infections multiples (33/50 et 19/50) et le nombre d'isolats portant les allèles multiples (10/50 et 4/50) a été plus important à Dabakala qu'à Ayamé. Arnot (1998) précise que ce nombre varie selon le niveau d'endémicité de la zone d'étude. Une situation contraire serait plus plausible puisque la transmission du paludisme est plus élevée à Ayamé par rapport à Dabakala. La différence dans l'épidémiologie locale de ces deux localités tient aux facteurs climatiques et autres facteurs environnementaux qui influencent le développement des anophèles vectrices du paludisme comme l'indiquent Koudou *et al.* (2010) et Raso *et al.* (2012).

Au contraire, d'autres auteurs comme Mueller *et al.* (1998) et Franckel *et al.* (2008) pensent que l'accès aux infrastructures de soin peut jouer aussi un rôle dans les variations de l'épidémiologie du paludisme. Plus les populations ont accès à des traitements efficaces, moins elles porteront de parasites. L'existence de disparités dans la répartition des structures de soin entre le Nord et le Sud, montre que les populations des localités du Sud disposent de plus de moyens de prise en charge que dans celle du Nord (Anonyme-3, 2011). La biodisponibilité des parasites pourrait baisser avec une bonne prise en charge facilitée par un accès aux soins.

Cependant l'impact de l'accessibilité aux soins dans la transmission du paludisme est un facteur mineur comparé à l'immunité de l'hôte ou au nombre de piqûres infectantes par personne. Les données sont en accord avec ceux de Mueller *et al.* (2012) qui indiquent que les cas cliniques de paludisme augmentent après la saison de pluie. En effet, la collecte d'isolats a été réalisée de novembre à février tant à Dabakala qu'à Ayamé. C'est une période que Raso *et al.* (2012) qualifient de modérément chaude. Elle succède à la période humide de juin à octobre encore appelée grande saison de pluie comme le rapporte Doannio *et al.* (2006). Le nombre d'isolats à infections multiple est plus la conséquence de l'augmentation de cas clinique de paludisme après les saisons de pluie.

Le nombre minimum de parasites par infection a sensiblement baissé entre 2002 et 2008 au sein des isolats issus d'Anonkoua-kouté au Sud de la Côte d'Ivoire. Ce nombre a été de 2 parasites par infection à Anonkoua-kouté, Ayamé et Dabakala au cours de l'année 2008-2009. Des résultats

similaires ont été mis en évidence par Noronate *et al.* (2007) qui ont utilisé le polymorphisme du block 1 du gène *msp1* dans la détection de la complexité des infections à *P. falciparum* au Sénégal. Les résultats corroborent les travaux d'auteurs comme Mueller *et al.* (2012) qui ont utilisé la technique de l'électrophorèse en champs pulsé du marqueur *msp2* dans l'étude de la complexité des infections. Les résultats pourraient indiquer que le nombre de clones de parasites associés est resté constant en dépit des interventions de lutte contre le paludisme cours des années d'étude. Les données obtenus avec les microsatellites Poly- α et TA81 sont en accords avec ceux d'Auburn *et al.* (2012) qui rapportent qu'en Afrique de l'Ouest le nombre de clones par infection déterminé avec les marqueurs *msp1* et *msp2* est compris entre 1 et 5 avec une moyenne de 2,82. Seul le microsatellite PFPK2 a mis en évidence un nombre maximum de 7 allèles par infection.

Au contraire, le nombre moyen d'allèles par infection obtenus avec les trois microsatellites est plus faible que ceux mis en évidence par Auburn *et al.* (2012) avec les marqueurs *msp1* ou *msp2* dans la sous-région. Au Burkina-Faso et au Mali, des moyennes de 2,33 et 1,90 allèles *msp1* ont été déterminées, respectivement. Avec *msp2*, les moyennes respectives ont été de 2,64 et 2,33 pour les même pays. Ces variations s'expliquent par la diversité génétique du parasite qui dépend elle-même du niveau de diversité de la population comme le notent Auburn *et al.* (2012).

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail a été de d'analyser l'évolution de la résistance à la SP et à la CQ et d'évaluer la diversité génétique des populations de *P. falciparum* (1897) en Côte d'Ivoire. La répartition des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques conventionnels est fonction du faciès épidémiologique d'où sont issus les isolats à l'étude. A Anonkoua-kouté, quoique le polymorphisme génétique des marqueurs moléculaires de résistance aient été plus importants au niveau des asymptomatiques, la différence des prévalences déterminées avec les symptomatiques n'a pas été significative. Cependant, pour des individus vivant sur des sites différents mais proches géographiquement, comme à Bonoua et Samo, le profil génétique des marqueurs a été très variable d'un site à l'autre. L'activité agroéconomique et les déplacements de populations y ont contribué pour beaucoup. Une importante consommation des antipaludiques conventionnels et une pression médicamenteuse préoccupante à la SP et à la CQ avant leurs remplacements dans la politique nationale de prise en charge du paludisme simple pourraient justifier ces observations.

A Anonkoua-kouté, au cours des six années d'étude répartie entre 2002 à 2008, les effets escomptés par le double changement de la politique de prise en charge du paludisme simple n'ont pas été observés. Les prévalences des marqueurs de résistance à la CQ sont restées constamment élevées pendant toute la période de l'étude, en particulier celles du triple mutant PfCRT CVIET. Une perte significative de la sensibilité de la SP résultant d'une baisse significative de la prévalence de l'haplotype sensible PfDHFR NCSI en faveur du triple mutant PfDHFR IRNI a été mise en évidence. En plus, une augmentation des prévalences du mutant PfDHPS AGKAA a été déterminée en même temps que la baisse significative de l'haplotype sensible PfDHPS SAKAA. De telles dynamiques des marqueurs moléculaires de résistance à la SP et à la CQ pourraient refléter une consommation importante et permanente de la SP et de la CQ à Anonkoua-kouté en dépit des décisions officielles de prise en charge du paludisme simple adoptées en 2005. Par ailleurs, la mise en évidence d'associations d'allèles comme les allèles Gly-581 et Phe-436 couplés au mixte Thr/Ser-613 du gène *pf dhps* indique aussi un niveau actuel important de la pression de sélection à la Sulfadoxine plus intense qu'en début d'étude. Des résultats similaires ont été observés au cours de l'année 2008-2009 avec l'ensemble des isolats issus d'Ayamé, un autre site d'étude situé au Sud. Au contraire, la sensibilité à la CQ et à la SP a été déterminée au niveau des isolats provenant de Dabakala au Nord. Des difficultés d'accès aux infrastructures de soin et de prise en charge, la qualité des services de santé par rapport aux pratiques thérapeutiques locales pourraient en être les raisons principales.

Dans les limites de l'expérimentation réalisée avec les 3 microsatellites, une baisse non signi-

ficative du niveau de la transmission du paludisme au cours des six dernières années, avec 3 clones par infection à géotypes multiples en 2002-2003 à 2 clones en 2008-2009. Beaucoup reste à faire pour que cette baisse se ressente autant au Nord qu'au Sud du pays. Le niveau d'infections à allèles multiple et le nombre d'individus portant les géotypes multiples varie de 6 à 8 % au Sud à 20 % à Dabakala.

PERSPECTIVES

Ce travail devrait être poursuivi dans les directions suivantes :

1. Etendre l'analyse de l'évolution moléculaire de la résistance aux antipaludiques aux principaux faciès épidémiologiques de Côte d'Ivoire.
2. Créer un système de surveillance des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques incluant les principaux faciès épidémiologiques de Côte d'Ivoire.
3. Définir les signatures laissées par les pressions de sélection à la SP et à la CQ sur le génome de *Plasmodium falciparum* en Côte d'Ivoire.
4. Analyser l'évolution de l'intensité de la pression de sélection due aux antipaludiques les plus consommés dans les principaux faciès épidémiologiques de Côte d'Ivoire.
5. Déterminer les lignées génétiques des parasites de *Plasmodium falciparum* résistant aux molécules antipaludiques officiellement utilisées en Côte d'Ivoire.
6. Déterminer le rôle des zones de régulation de l'expression des gènes dans l'adaptation de *Plasmodium falciparum*.

RECOMMANDATIONS

A l'endroit des populations :

Il est impératif d'avoir une bonne hygiène domiciliaire et environnementale afin de supprimer les gîtes larvaires. L'utilisation effective de la moustiquaire imprégnée d'insecticide surtout chez les enfants et les femmes enceintes permettra de réduire la morbidité et la mortalité imputables au paludisme. Par ailleurs, il faut se faire consulter par un médecin dès l'apparition d'une fièvre, surtout lorsqu'il s'agit d'un enfant de moins de 5 ans et d'une femme enceinte. Enfin, la bonne observance des traitements antipaludiques permettra d'en préserver leur efficacité.

Au personnel de santé

Il est chargé d'assurer une prise en charge correcte des cas de paludisme. Cela passe par la prescription des antipaludiques efficaces à doses correctes. A cela s'ajoute un rôle d'éducation et de sensibilisation des populations au respect des schémas thérapeutiques et à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides.

Aux autorités politiques et sanitaires

Elles doivent aider à assainir le cadre de vie des citoyens par l'aménagement de l'environnement et la collecte des ordures. La subvention des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés d'artémisinine permettra leur accès à la population. Ces molécules sont actuellement recommandées dans la prise en charge du paludisme mais assez coûteux.

Au programme national de lutte contre le paludisme (PNLP)

Le programme doit instituer des journées scientifiques qui serviraient de plateforme d'échanges et de collaborations entre chercheurs travaillant sur la résistance aux antipaludiques et aux insecticides. Des rapports réguliers émanant des centres de recherches informeraient sur les niveaux de résistance aux antipaludiques dans les sites sentinelles du pays et leur évolution. Il lui incombe de renforcer en équipements de laboratoire les centres de recherches comme celui de l'Unité de Paludologie de l'IPCI qui ont en charge la surveillance épidémiologique de la résistance de *Plasmodium falciparum* antipaludiques. Les instances de décisions doivent associer les paludologues dans les prises de décisions de changement de politiques de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire.

A l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI)

Il faut renforcer le plateau technique de l'institut pasteur et accorder à l'unité de paludologie les moyens conséquents pour étendre les travaux de recherches sur l'épidémiologie moléculaire de la résistance aux antipaludiques à l'ensemble des sites sentinelles du pays. Il peut contribuer à la mise en place d'une base de données sur les niveaux de résistance en Côte d'Ivoire. L'organisation de conférences institutionnelles pour informer la communauté scientifiques de l'intérêt de l'épidémiologie génétique dans la recherche sur les pathologies tropicales et les maladies négligées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adja AM, N'goran EK, Koudou BG, Dia I, Kengne P, Fontenille D, Chandre F. (2011). Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 105, 13-24.
- Adjetei TA, Affoumou GB, Loukou DD, Nebavi NG, Barro-Kiki P, Menan EI, Yavo W, Kone M. (2005). Evaluation of the therapeutic efficacy of amodiaquine versus chloroquine in the treatment of uncomplicated malaria in Abié, Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 98, 193-196.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH., Mann DG, Mccourt RM., Leonel M, Moestrup Ø, Mozley-Standridg. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 399-451.
- Adou-Bryn KD, Krelo K, Akoussi CFG, Boni NMC, Yapo CG, Penali LK, Ouhon J, Assoumou A, Ehouman A. (2002). Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement du paludisme simple dû à *Plasmodium falciparum* des consultants hospitaliers dans le centre de la Côte d'Ivoire (1997-2000). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95, 262-264.
- Adou-Bryn KD, Memain SD, Ouhon J, Assoumou A, Kone M. (1999). Etude de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine à Man (Ouest de la Côte-d'Ivoire). *Médecine et maladies infectieuses*, 29, 476-479.
- Adou-Bryn KD, Ouhon J, Yapo CG, N'guettia KS, Kouakou KAE, Adou SJ, Kouabenan A, Assoumou A. (2004). Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* de l'enfant dans l'est de la Côte-d'Ivoire (1999-2002). *Médecine et maladies infectieuses*, 34, 127-131.
- Agresti, A. (1990). *Categorical data analysis* (1st edition). New York: John Wiley and Sons. 710 pp
- Alam MT, de Souza DK, Vinayak, Griffing SM, Poe AC, Duah NO, Ghansah A, Asamoah K, Slutsker L, Wilson MD, Barnwell JW, Udhayakumar V, Koram KA. (2011). Selective sweeps and genetic lineages of *Plasmodium falciparum* drug - resistant alleles in Ghana. *Journal of Infectious Diseases*, 203, 220-227.
- Alirol E, Getaz L, Stoll B, Chappuis F, Loutan L. (2010). Urbanization and infectious diseases in a globalised world. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 131-141.
- Al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. (1997). Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area:

- a prospective community study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 602-605.
- Andersag H, Breitner S, Jung H. (1934). Quinoline compound and process making the same. *US patent n°2233970*.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Moki J, Mharakurwa S, Fench N, Whitworth J, Velez ID, Brockmann AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. (2000). Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution*, 17 (10), 1467-1482.
- Anderson TJ, Patel J, Ferdig MT. (2009). Gene copy number and malaria biology. *Trends in Parasitology*, 25, 336-343.
- Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. (1999). Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology*, 119, 113-125.
- Anderson TJC, Nair S, Nkhoma S, Williams JT, Imwong M, Yi P, Socheat D, Das D, Chotivanich K, Day NPJ, White NJ, and Dondorp AM. (2010). High heritability of malaria parasite clearance rates indicates a genetic basis for artemisinin resistance in Western Cambodia. *Journal of Infectious Diseases*, 201, 1326-1330.
- Anderson, T. (2009). Mapping the speed of malaria drug resistance. *Plos Medicine*, 6, e1000054.
- Andersson, D. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology*, 9, 461 - 65.
- Andriantsoanirina V, Lascombes V, Ratsimbaoa A, Bouchier C, Hoffman J, Tichit M, Rabarijaona L-P, Durand R, Ménard D. (2009). Rapid detection of point mutations in *Plasmodium falciparum* genes associated with antimalarial drugs resistance by using High-Resolution Melting analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 165-170.
- Anglaret X, Chene G, Attia A, Toure S, Lafont S, Combe P, Manlan K, Dri-Yoman T, Salamon R, 1999. Early chemoprophylaxis with trimethoprim-sulphamethoxazole for HIV-1 infected adults in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomized trial. Cotrimo-CI Study Group. *Lancet* 353, 1463-1468.
- Andolfatto, P. (2001). Adaptive hitchhiking effects on genome variability. *Current opinion in genetics & development* 11, 635-641
- Anonyme-1. (1986). Chimiosensibilité à la chloroquine du paludisme à *Plasmodium falciparum* : Recommandations et conclusions. *Séminaire internationale*. Abidjan: CCCD, USAID et ministère de la santé publique en Côte d'Ivoire.

- Anonyme-2. (2008). *Directives nationales de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire*. Abidjan: Côte d'Ivoire : ministère de la santé et de l'hygiène publique.
- Anonyme-3. (2011). *Stratégie de coopération de l'OMS avec la Côte d'Ivoire : analyse de la situation, la politique nationale de santé 2009-2013*. OMS. 49 pp
- Anonyme-4. (2012). *Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples de Côte d'Ivoire 2011-2012*. Claverons, Maryland, USA: INS et ICF International, 561 pp.
- Archibald, H. (1951). Field trials on a new schizonticide. *British Medical Journal*, 2, 821-823.
- Ariey F, Duchemin JB, Robert V. (2003). Metapopulation concepts applied to falciparum malaria and their impacts on the emergence and spread of chloroquine resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 2, 185-192.
- Ariey F, Fandeur T, Durand R, Randrianariveolosia M, Jambou R, Legrand E, Ekala MT, Bouchier C, Cojean S, Duchemin JB, Robert V, LeBras J, Mercereau-Puijalon O. (2006). Invasion of Africa by a single *pfert* allele of South-east Asian type. *Malaria Journal*, 5, 34.
- Armitage, P. (1955). Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics*, 11, 375-386.
- Arnot, D. (1998). Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 580-585.
- Asenso-Okyere K, Asante FA, Tarekegn J, Andam KS. (2009). *The linkages between agriculture and malaria: issues for policy, research, and capacity strengthening*. IFPRI Discussion Paper 00861. Washington DC: International food policy research institute.
- Assi SB, Ouattara L, Adja AM, Tchiekoi NB, Lingué N, Ahoua Alou PL, Koffi AA, Yavo W, Koné M, Djaman AJ. (2010). Epidemiology of malaria in urban area (Adzopé city, Côte d'Ivoire). *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 5, 94-100
- Aubouy A, Jafari S, Huart V, Migot-Nabias F, Mayombo J, Durand R, Bakary M, Le Bras J, Deloron P. (2003). DHFR and DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *Journal of Antimicrobiology and Chemotherapy*, 52, 43-9.
- Auburn S, Campino S, Miotto O, Djimde AA, Zongo I, Manske M, Maslen G, Mangano V, Alcock D, MacInnis B, Rockett KA, Clark TG, Doumbo OK, Ouédraogo JB, Kwiatkowski P. (2012). Characterization of within-host *Plasmodium falciparum* diversity using next-generation sequence data. *PLoS One*, 7, e32891.
- Audibert M, Motel PC, Drabo A. (2010). *Document de travail de la série Etudes et Documents*. Clermont-Ferrand: Centre d'Etudes et de Recherches sur le Développement International (CERDI).E2010.36, 34 pp

- Baker, D. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172, 57-65.
- Baliraine FN, Nsobya SL, Achan J, Tibenderana JK, Talisuna AO, Greenhouse B, Rosenthal PJ. (2011). Limited ability of *Plasmodium falciparum* *pfprt*, *pfmdr1*, and *pfhne1* polymorphisms to predict quinine in vitro sensitivity or clinical effectiveness in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 615-622.
- Bannister L, Mitchell G. (2003). The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in Parasitology*, 19, 209-213.
- Basco L, Ringwald P. (2000). [Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches]. *Santé*, 10, 47-50.
- Basco LK, Tahar R, Ringwald P. (1998). Molecular basis of in vivo resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1811-1814.
- Bellanger A, Bruneel F, Barnot O, Mira J, Millon L, Houzé P, Faucher JF, Houzé S. (2010). Severe *Plasmodium malariae* malaria in a patient with multiple susceptibility genes. *Journal of Travel Medicine*, 17, 201 - 202.
- Benkovic SJ, Cameron CE. (1995). Kinetic analysis of nucleotide incorporation and misincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Methods in Enzymology*, 262, 257-269.
- Betsi N, Koudou B, Cissé G, Tschannen AB, Pignol A, Ouattara Z, Madougou M, Tanner M, Utzinger J. (2006). Effect of an armed conflict on human resources and health systems in Côte d'Ivoire: prevention of and care for people with HIV/AIDS. *AIDS Care*, 18, 356-365.
- Bhakuni DS, Goel AK, Jain S, Mehrotra BN, Patnaik GK, Prakash V. (1988). Screening of Indian plants for biological activity: part XIII. *Indian Journal of Experimental Biology*, 26, 883-904.
- Bhakuni DS, Goel AK, Jain S, Mehrotra BN, Srimal RC. (1990). Screening of Indian plants for biological activity: part XIV. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 619-637.
- Bharti PK, Alam MT, Boxer R, Shukla MM, Gautam SP, Sharma YD, Singh N. (2010). Therapeutic efficacy of chloroquine and sequence variation in *pfprt* gene among patients with *falciparum* malaria in central India. *Tropical Medicine and International Health*, 15, 33-40.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 392, 289-292.
- Bloland, P. (2001). *Drug Resistance in Malaria*. Geneva: WHO. 32 pp
- Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S, Henry M, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C. (2006). Genetic diversity and structure of

- african *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 953-959.
- Briolant S, Pelleau S, Bogreau H, Hovette P, Zettor A, Castello J, Baret E, Pradines B. (2011). In vitro susceptibility to quinine and microsatellite variations of the *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger (*pfhhe-1*) gene: The absence of association in clinical isolates from the Republic of Congo. *Malaria Journal*, 10, 1-7.
- Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. (1994). Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry*, 224, 397-405.
- Brown KM, Costanzo MS, Xu W, Roy S, Lozovsky ER, Hartl DL. (2010). Compensatory mutations restore fitness during the evolution of dihydrofolate reductase. *Molecular Biology and Evolution*, msq160.
- Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CG, Clyde DF, Peters W, Wensdorf W. (1986). Chemotherapy of malaria. *WHO Monograph Series*, 2, 27 pp.
- Charmot G, Amat-Roze JM, Rodhain F, Le Bras J et Coulaud JP. (1991). Abord géographique de la chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique tropicale. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 71, 187-197.
- Charmot G, Le Bras J, Doury JC, Baudon D, Roue R, Le Bras M, Cuisenier JC, Morillon M, Coulaud JP. (1988). Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Ivory Coast. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 392-3.
- Cheesman S, Creasey A, Degnan K, Kooij T, Afonso A, Cravo P, Carter R, Hunt P. (2007). Validation of PyrosequencingTM for accurate and high throughput estimation of allele frequencies in malaria parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152, 213-219.
- Chico RM, Pittrof R, Greenwood B, Chandramohan D. (2008). Azithromycin-chloroquine and the intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy. *Malaria Journal*, 7, 255.
- Clyde DF, Shute GT. (1957). Résistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 51, 505-513.
- Clyde, D. (1972). The problem of drug-resistant malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21, 736-743.
- Cochran, W. (1954). Some methods for strengthening the common Chi-square tests. *Biometrics*, 10, 417-451.

- Colin JP, Kouamé G, Soro D. (2007). Outside the autochthon-migrant configuration. Access to land, land conflicts and inter-ethnic relationships in a former pioneer area (Lower Côte d'Ivoire). *The Journal of Modern African Studies*, 45, 33-59.
- Conover, W. J. (1999). *Practical nonparametric statistics* (3rd ed.). Wiley. 592 pp
- Cooper WC, Myatt AV, Hernandez T, Jeffery GM, Coatney GR. (1953). Studies in human malaria. XXXI. Comparison of primaquine, isopentaquine, SN-3883, and pamaquine as curative agents against Chesson strain vivax malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2, 949-957.
- Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. (2002). Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 999-1006.
- Coteron JM, Marco M, Esquivias J, Deng X, White KL, White J, Koltun M, Mazouni FE, Kokkonda S, Katneni K, Bhamidipati R, Shackelford DM, Angulo-Barturen I, Ferrer SB, Jiménez-Díaz MB, Belén M, Gamo FJ, Goldsmith EJ, Charman WN, Bathurst I, Floyd D, Mat. (2011). Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 5540-5561.
- Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. (1998). Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 9109-9113.
- Cox-Singh J, Singh B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in Parasitology*, 24, 406-410.
- Cramer A, Marfurt J, Mugittu K, Maire N, Regos A, Coppee JY, Sismeiro O, Burki R, Huber E, Laudsher D, Puijalón O, Genton B, Felger I, Peck HP. (2007). Rapid microarray-based method for monitoring of all currently known single-nucleotide polymorphisms associated with parasite resistance to antimalaria drugs. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 3685-3691.
- de Roode JC, Culleton R, Cheesman SJ, Carter R, Read AF. (2004). Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. *Proceedings Biological Sciences*, 271, 1073-1080.
- de Vries PJ, Bich NN, Van Thien H, Hung LN, Anh TK, Kager PA, Heisterkamp SH. (2000). Combinations of artemisinin and quinine for uncomplicated falciparum malaria: efficacy and pharmacodynamics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44, 1302-1308.
- DeLuca, P. (1976). Research and development of pharmaceutical dosage forms. *Developmental Biology Standards*, 36, 41-50.

- Descheemaeker PN, Mira JP, Bruneel F, Houzé S, Tanguy M, Gangneux JP, Flecher E, Rousseau C, Le Bras J, Mallédant Y. (2009). Near-fatal multiple organ dysfunction syndrome induced by *Plasmodium malariae*. *Emerging Infectious Diseases*, *15*, 832-834.
- Djaman AJ, Basco LK, Mazabraud A. (2002). Monitoring the chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria in Yopougon (Abidjan): in vivo study of chloroquine sensitivity and evaluation of pyrimethamine resistance following the analysis of point mutation in the dihydrofolate reductase. *Santé*, *12*, 363-367.
- Djaman J, Ahibo H, Yapi FH, Bla BK, Ouattara L, Yavo W, N'guessan JD, Yapo A, Mazabraud A. (2010). Molecular monitoring of falciparum malaria isolates in Côte d'Ivoire: genetic markers (*dhfr-ts*, *dhps*, *pfprt*, *pfmdr-1*) for antimalarial-drugs resistance. *European Journal of Scientific Research*, *40*, 461-470.
- Djaman JA, Abouanou S, Basco L, Kone M. (2004a). Limites de l'efficacité de la chloroquine et de la sulfadoxine-pyriméthamine au nord de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire): étude couplée in vivo/in vitro. *Santé*, *14*, 205-209.
- Djaman JA, Kauffi PC, Yavo W, Basco LK, Kone M. (2004b). Evaluation in vivo de l'efficacité thérapeutique de l'association sulfadoxine-pyriméthamine au cours du paludisme non compliqué chez les enfants de Yopougon (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *97*, 180-182.
- Djaman JA, Mazabraud A, Basco L. (2007). Sulfadoxine-pyriméthamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *101*, 103-112.
- Djé KM, Djaman AJ, Mazabraud A, Guedé-Guina F. (2000). La prévalence de la résistance aux antifoliques de *P. falciparum* en Côte d'Ivoire : évaluation de la fréquence des mutations du codon 108 de la DHFR à l'aide de confettis sur papier filtre wattman 3MM. *Journal of Science and Pharmaceutical Biology (PUCI)*, *2*, 63-76.
- Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV. (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, *344*, 257-263.
- Djimdé AA, Dolo A, Ouattara A, Diakité S, Plowe CV, Doumbo OK. (2004). Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *Journal of Infectious Diseases*, *190*, 853-855.
- Doannio JMC, Doudou DT, Konan LY, Djouaka R, Pare Toe L, Baldet T, Akogbeto M, Monjour L. (2006). Représentations sociales et pratiques liées à l'utilisation des moustiquaires dans la lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire (Afrique de l'Ouest). *Médecine Tropicale*, *66*, 45-52.

- Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouedraogo JB, Rosenthal PJ. (2006). Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 162-165.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey 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, Lindergardh N, Socheat D, White NJ. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 361, 455-467.
- Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, von S Lorenz. (2010). Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature reviews microbiology*, 8, 272-280.
- Dossou-Yovo J, Amalaman K, Carnevale P. (2001). Itinéraires et pratiques thérapeutiques antipaludiques chez les citoyens de Bouaké, Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale*, 61, 495-499.
- Douchet CJJ, G'bary R, Houon J, Payne D. (1984). *Plasmodium falciparum* sensitivity to Chloroquine in the Buyo Region, Ivory Coast. *Bulletin of the World Health Organization*, 62, 777 - 781.
- Dow GS, M Erin, Bathurst I, Bhonsle J, Caridha D, Gardner S, Gerena L, Kozar IM, Lanteri C, Mannila A, McCalmont W, Moon J, Read KD, Norval S, Roncal N, Shackelford DM, Sousa J, Steuten J, White KL, Zeng Q, Susan A Charman SA. (2011). Central nervous system exposure of next generation quinoline methanols is reduced relative to mefloquine after intravenous dosing in mice. *Malaria Journal*, 10, 1-11.
- Dzikowski R, Deitsch KW. (2009). Genetics of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Current Genetics*, 55, 103-110.
- Eboubou Moukoko EC, Bogreau H, Briolant S, Pradines B, Rogier C. (2009). Molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Médecine Tropicale: revue du corps de santé coloniale*, 69, 606-612.
- Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424, 957-961.
- Effert T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M. (2008). The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 804-811.
- Effert, T. (2007). Willmar Schwabe Award 2006: Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin - From bench to bedside. *Planta Medicine*, 73, 299-309.
- Efunshile M, Runsewe-Abiodun T, Ghebremedhin B, König W, König B. (2011). Prevalence of the molecular marker of chloroquine resistance (*pfcr76*) in Nigeria 5 years after withdrawal of the drug as first-line antimalarial: A cross-sectional study. *South African Journal of Child Health*, 5, 39-42.

- Enosse S, Magnussen P, Abacassamo F, Gómez-Olivier X, Rønn AM, Thomson R, Alifrangis M. (2008). Rapid increase of *Plasmodium falciparum dhfr/dhps* resistant haplotypes, after adoption of sulfadoxine/pyriméthamine as first line treatment in 2002, in southern Mozambique. *Malaria Journal*, 7, 1-7.
- Ewing B, Green P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Researches* 8, 186-194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Researches*, 8, 175-185.
- Felger I, Beck HP. (2002). Genotyping of *Plasmodium falciparum*. PCR-RFLP analysis. *Methods Molecular Medicine*, 72, 117-129.
- Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, Wellem TE. (2004). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 52, 985-997.
- Ferone, R. (1977). Folate metabolism in malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 55, 291-298.
- Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sihdu AB, Naude B, Deitsch KW, Su X, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6, 861-871.
- Flateau C, Le Loup G, Pialoux G. (2011). Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 7, 541-556.
- Fogh S, Schapira A, Bygbjerg IC, Jepsen S, Ravn P, Rønn A, Mordhorst CH, Kuijlen K, Gøtzsche PG. (1988). Malaria chemoprophylaxis in travellers to East Africa: a comparative prospective study of Chloroquine plus Proguanil with Chloroquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine. *British Medical Journal*, 296, 820-822.
- Franckel A, Arcens F, Lalou R, Kneipp R. (2008). Village context and health-seeking behavior in the Fatik region of Senegal. *Population, English edition*, 63, 469-490.
- Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. (2008). *Plasmodium* sporozoit passage across the sinusoidal cell layer. (D. S.-F. Barbara A Burleigh, Éd.) *Molecular mechanism of parasite invasion*, pp. 183-197.
- Frevert, U. (2004). Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends in Parasitology*, 20, 417-424.
- Frosch AEP, Venkatesan M, Laufer MK. (2011). Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malaria Journal*, 10, 1-10.
- Fürst T, Raso G, Acka CA, Tschannen AB, N'Goran EK, Utzinger J. (2009). Dynamics of socioeconomic risk factors for neglected tropical diseases and malaria in an armed conflict. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, e513.

- Gadalla NB, Elzaki SE, Mukhtar E, Warhurst DC, El-Sayed B, Sutherland CJ. (2010). Dynamics of *pfcr* alleles CVMNK and CVIET in chloroquine-treated Sudanese patients infected with *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 9, 1-10.
- Gama BE, de Oliveira NK Almeida, GZ Mariano, de Souza JM, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. (2009). Chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area. *Malaria Journal*, 8, 1-5.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan M, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 498-511.
- Gbotosho GO, Okuboyejo TM, Happi CT, Sowunmi A. (2011). *Plasmodium falciparum* hyperparasitaemia in Nigerian children: epidemiology, clinical characteristics, and therapeutic responses to oral artemisinin-based combination treatments. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*, 1, 85-93.
- Gentilini, M. (1993). Maladies parasitaires : paludisme. Dans *Médecine tropicale*. Paris: Médecine/Sciences. Flammarion. (éd. 5ème tirage actualisé, pp. 91-122)
- Genton B, D'Acremont V, Rare L, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Müller I. (2008). *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *Plos Medicine*, 5, e127.
- Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, Tatem AJ, Hay SI. (2011). A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria Journal*, 10, 1-16.
- Gibson G, Muse VS. (2004). SNP et variation. Dans *Précis de génomique* (éd. 1 ère). Bruxelles: DeBoeck Université. 241-288 pp
- Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical Pharmacology*, 56, 1305-1313.
- Girardin O, Dao D, Koudou BG, Essé C, Cissé G, Yao T, N'Goran EK, Tschannen AB, Bordmann G, Lehmann B, Nsabimana C, Keiser J, Killeen GF, Singer BH, Tanner M, Utzinger J. (2004). Opportunities and limiting factors of intensive vegetable farming in malaria endemic Côte d'Ivoire. *Acta Tropica*, 89, 109-123.
- Goldberg DE, Cowman AF. (2010). Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. *Nature Review Microbiology*, 8, 617-621.
- Granado S, Manderson L, Obrist B, Tanner M. (2011). Appropriating "Malaria": local responses to malaria treatment and prevention in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Medical Anthropology*, 30, 102-121.

- Granado S, Obrist B, Manderson L, Tanner M. (2009). 'The moment of sale: Treating malaria in Abidjan, Côte d'Ivoire'. *Anthropology & Medicine*, 16, 319 - 331.
- Gregson A, Plowe CV. (2005). Mechanisms of résistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological Review*, 57, 117-145.
- Grimmond TR, Donovan KO, Riley ID. (1976). Chloroquine resistant malaria in Papua New Guinea. *Papua New Guinea Med. J.*, 19, 184-185.
- Hamel MJ, Holtz T, Mkandala C, Kaimila N, Chizani N, Bloland P, Kublin J, Kazembe P, Steketee R. (2005). Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole compared with sulfadoxine-pyrimethamine plus erythromycin for the treatment of uncomplicated malaria in children with integrated management of childhood illness dual classifications of malaria and pneumonia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 609-15.
- Hasting, I. (2001). Modelling parasite drug resistance: lesson from management and control strategies. *Tropical Medicine and International Health*, 6, 883-890.
- Hastings MD, Bates SJ, Blackstone EA, Monks SM, Mutabingwa TK, Sibley CH. (2002). Highly pyrimethamine-resistant alleles of dihydrofolate reductase in isolates of *Plasmodium falciparum* from Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 674-676.
- Hay SI, Rogers DJ, Toomer JF, Snow RW. (2010). Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, Internet access and review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 113-127.
- Henry MC, Eggelte A, Watson P, van Leeuwen D, Bakker DA, Kluin J. (1996). Response of childhood malaria to Chloroquine and Fansidar in an area of intermediate Chloroquine résistance in Côte d'Ivoire. *Tropical Medicine and International Health*, 1, 610-615.
- Henry M-C, Niangue J, Kone M. (2002). Quel médicament pour traiter le paludisme simple quand la chloroquine devient inefficace dans l'ouest de la Cote d'Ivoire ? *Médecine Tropical*, 62, 55-57.
- Hirschhorn JN, Sklar P, Lindblad-Toh K, Lim YM, Ruiz-Gutierrez M, Bolk S, Langhorst B, Schaffner S, Winchester E, Lander ES. (2000). SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 12164-121.
- Hsu, E. (2006). The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 505-508.
- Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL. (2007). Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 51, 991-997

- Hunt P, Martinelli A, Modrzynska K, Borges S, Creasey A, Rodrigues L, Beraldi D, Loewe L, Fawcett, Kumar S, Thomson M, Trivedi U, Otto TD, Pain A, Blaxter M, Cravo P. (2010). Experimental evolution, genetic analysis and genome re-sequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites. *BMC Genomics*, *11*, 499.
- Ibrahim ML, Steenkeste N, Khim N, Adam HH, Konaté L, Coppée JY, Arieu F, Duchemin JB. (2009). Field-based evidence of fast and global increase of *Plasmodium falciparum* drug-resistance by DNA-microarrays and PCR/RFLP in Niger. *Malaria Journal*, *8*, 1-9.
- Ingstad B, Munthali AC, Braathen SH, Grut L. (2012). The evil circle of poverty: a qualitative study of malaria and disability. *Malaria Journal*, *11*, 1-6.
- Iyer JK, Milhous WK, Cortese JF, Kublin JG, Plowe CV. (2001). *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet*, *358*, 1066-1067.
- Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O, Durand R. (2004). *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*, 195-203.
- Jani D, Nagarkatti R, Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, Kumar S, Rathore D. (2008). HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathogens*, *4*, e1000053.
- Jansen FH, Lesaffre E, Penali LK, Zattera M-JG, Die-Kakou H, Bissagnene E. (2007). Assessment of the relative advantage of various artesunate-based combination therapies by a multi-treatment bayesian random-effects meta-analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*, 1005-1009.
- Jones, S. (1958). Mass treatment with pyrimethamine: a study of resistance and cross resistance resulting from a field trial in the hyperendemic malarious area of Makueni, Kenya, September 1952-September 1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *52*, 547-561.
- Karamohamed S, Nilsson J, Nourizad K, Ronaghi M, Pettersson B, Nyrén P. (1999). Production, purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, *15*, 381-388.
- Kassi RR, Yavo W, Mokak DGA, Menan HIE, Barro-Kiki CP, Bamba A, Pénali KL, Koné M. (2004). Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement du paludisme simple dû à *Plasmodium falciparum* chez les enfants du dispensaire de San Pedro en Côte d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *97*, 129-130.
- Katz I, Komatsu R, Low-Beer D, Atun R. (2011). Scaling up towards international targets for AIDS, tuberculosis, and malaria: contribution of global fund-supported programs in 2011-2015. *PLoS One*, *6*, e17166.
- Kaufman TS, Ruveda EA. (2005). The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war. *Angewandte Chemie International Edition English*, *44*, 854-885.

- Kayentao K, Doumbo OK, Pénali LK, Offianan AT, Bhatt KM, Kimani J, Tshefu AK, Kokolomami JHT, Ramharter M, de Salazar PM, Tiono AB, Ouédraogo A, Bustos MD, Quicho F, Fuhrer IB, Fleckenstein L. (2012). Pyronaridine-artesunate granules versus artemether-lumefantrine crushed tablets in children with *Plasmodium falciparum* malaria: A randomized controlled trial. *Malaria Journal*, *11*, 1-16.
- Kebede A, McCann JC, Kiszewski E, Ye-Ebiyo Y. (2005). New evidence of the effects of agro-ecologic change on malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*, 676-680.
- Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M, Singer BH. (2004). Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *71*, 118-127.
- Khalil I, Rønn AM, Alifrangis M, Gabar HA, Satti GM, Bygbjerg IC. (2003). Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with in vitro resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxine, and sulfamethoxazole. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *69*, 122.
- Khim N, Bouchier C, Ekala MT, Incardona S, Lim P, Legrand E, Jambou R, Doung S, Puijalon OM, Fandeur T. (2005). Countrywide survey shows very high prevalence of *Plasmodium falciparum* multilocus resistance genotypes in Cambodia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, *49*, 3147-3152.
- Kizito J, Kayendeke M, Nabirye C, Staedke SG, Clare IR, Chandler. (2012). Improving access to health care for malaria in Africa: a review of literature on what attracts patients. *Malaria Journal*, *11*, 1-14.
- Klenow H, Overgaard-Hansen K, Patkar SA. (1971). Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage. *European Journal of Biochemistry*, *22*, 371-381.
- Klinkenberg E, McCall PJ, Hastings IM, Wilson MD, Amerasinghe FP, Donnelly MJ. (2005). Malaria and irrigated crops, Accra, Ghana. *Emerging Infectious Diseases*, *11*, 1290-1293.
- Klinkenberg E, McCall PJ, Wilson MD, Amerasinghe FP, Donnelly MJ. (2008). Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malaria Journal*, *7*, 1-9.
- Koella JC, Antia R. (2003). Epidemiological models for the spread of anti-malarial resistance. *Malaria Journal*, *2*, 1-11.
- Komoszyński M, Wojtczak A. (1996). Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta*, *1310*, 233-41.
- Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RAG, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimdé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. (2003). Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*, *187*, 1870-1875.

- Kublin JK, Dzinjalimala FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RAG, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. (2002). Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 380-388.
- Kyabayinze D, Achan J, Nakanjako D, Mpeka B, Mawejje H, Mugizi R, Kalyango JN, D'Alessandro U, Talisuna A, Van geertruyden Jean-Pierre. (2012). Parasite-based malaria diagnosis: Are Health Systems in Uganda equipped enough to implement the policy? *BMC Public Health*, 12, 695.
- Laufer MK, Plowe CV. (2006). Cotrimoxazole prophylaxis and malaria in Africa: have the important questions been answered? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 373-374
- Laufer MK, Plowe CV. (2004). Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resistance Updates*, 7, 279-288.
- Leclerc M-C, Durand P, de Meeûs T, Robert V, Renaud F. (2002). Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes and Infections*, 4, 685-692.
- Lee EY, Maguire JH. (1999). Acute pulmonary edema complicating *ovale* malaria. *Clinical Infectious Disease*, 29, 697-698.
- Lee KS, Cox-Singh J, Brooke G, Matusop A, Singh B. (2009). *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *International Journal of Parasitology*, 39, 1125-1128.
- Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, Chongsuohajaisiddhi T, Nosten F. (1996). The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 105-111.
- Lynch M and Walsh B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, UK: Sinauer Associates, Inc. 803 pp.
- Mackinnon MJ, Marsh K. (2010). The selection landscape of malaria parasites. *Science*, 328 (866).
- Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Review Microbiology*, 7, 341-354.
- Maïga O, Djimde AA, Hubert V, Renard E, Aubouy A, Kironde F, Nsimba B, Koram K, Doumbo OK, Le Bras J, Clain J. (2007). A shared Asian origin of the triple-mutant *dhfr* allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 196, 165-172.
- Malamba SS, Mermin J, Reingold A, Lule JR, Downing R, Ransom R, Kigozi A, Hunt BM, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G. (2006). Effect of cotrimoxazole prophylaxis taken by human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons on the selection of sulfadoxine-pyrimethamine-

- resistant malaria parasites among HIV uninfected household members. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 375-380.
- Males S, Gaye O, Garcia A. (2008). Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 516-522.
- Malisa AL, Pearce RJ, Abdulla S, Mshinda H, Kachur PS, Bloland P, Roper C. (2010). Drug coverage in treatment of malaria and the consequences for resistance evolution - evidence from the use of sulphadoxine/pyrimethamine. *Malaria Journal*, 9(190), 1-12.
- Marascuilo LA, Serlin RC. (1988). *Statistical methods for the social and behavioral sciences. A series of books in psychology*. New York, NY, US: W H Freeman/Times Books/ Henry Holt & Co. 804 pp.
- Marks F, Evans J, Meyer CG, Browne EN, Flessner C, von Kalckreuth V, Eggelte TA, Horstmann RD, May J. (2005). High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the Ashanti region of Ghana. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, 1101-1105.
- Matthys B, Koudou BG, N'goran EK, Vounatsou P, Gosoni L, Kone M, Cisse G, Utzinger J. (2010). Spatial dispersion and characterization of mosquito breeding habitats in urban vegetable-production areas of Abidjan, Cote d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104 (8), 649-666.
- Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, Gosoni L, Cissé G, Tanner M, N'Goran EK., Utzinger J. (2006). Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 1223-1231.
- Mayengue PI, Luty AJF, Rogier C, Baragatti M, Kremsner PG, Ntoumi F. (2009). The multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections is associated with acquired immunity to asexual blood stage antigens. *Microbes and Infection* 11, 108-114.
- McCollum AM, Basco LK, Tahar R, Udhayakumar V, Escalante AA. (2008). Hitchhiking and selective sweeps of *Plasmodium falciparum* sulphadoxine and pyrimethamine resistance alleles in a population from central Africa. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 52, 4089-4097.
- McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. (2007). Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine resistance in a low transmission area in South America. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 51, 2085.
- McCollum AM, Poe AC, Hamel M, Huber C, Zhou Z, Shi YP, Ouma P, Vulule J, Bloland P, Slutsker L, Barnwell JW, Udhayakumar V, Escalante AA. (2006). Antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: multiple origins and identification of novel *dhfr* alleles. *Journal of Infectious Diseases* 194, 189-197.

- McGready R, Ashley EA, Moo E, Cho T, Barends M, Hutagalung R, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. (2005). A randomized comparison of artesunate-atovaquone-proguanil versus quinine in treatment for uncomplicated falciparum malaria during pregnancy. *Journal of Infectious Diseases*, 192, 846-853.
- Meissner PE, Mandi G, Mockenhaupt FP, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Frey C, Merkle H, Burhenne J, Walter-Sack I, Müller O. (2008). Marked differences in the prevalence of chloroquine resistance between urban and rural communities in Burkina Faso. *Acta Tropica* 105, 81-86.
- Menan EI, Yavo W, Oga SS, Evi JB, Kiki-Barro PC, Kassi RR, Atissou JF, Kone M. (2007). Open randomized study comparing chloroquine and amodiaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Aboisso, Côte d'Ivoire. *Médecine Tropicale* 67, 309-310.
- Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, do Rosario VE, Benito A, Berzosa P, Arez AP. (2011). Duffy Negative Antigen Is No Longer a Barrier to *Plasmodium vivax* - Molecular Evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1192.
- Mermin J, Lule J, Edward JP, Hughes P, Funnel R, Malamba S, Ransom R, Kajaruzza F, Coutinho A, Kigozi A, Quick R. (2005). Cotrimoxazole prophylaxis by HIV-infected persons in Uganda reduces morbidity and mortality among HIV-uninfected family members. *AIDS*, 19, 1035-1042.
- Meshnick, S. (1994). The mode of action of antimalarial endoperoxides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, S31-S32.
- Min, H. (2012). Mapping the supply chain of anti-malarial drugs in Sub-Saharan African countries'. *International Journal of Logistics Systems and Management*, 11, 1-23.
- Mita T, Tanabe K, Takahashi N, Culleton R, Ndounga M, Dzodzomenyo M, Akhwale WS, Kaneko A, Kobayakawa T. (2009). Indigenous evolution of *Plasmodium falciparum* pyrimethamine resistance multiple times in Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 252-255.
- Mok S, Imwong M, Mackinnon MJ, Sim J, Ramadoss R, Yi P, Mayxay M, Chotivanich K, Liong K-Y, Russell B, Socheat D, Newton PN, Day NPJ, White NJ, Preiser PR, Nosten F, Dondorp AM, Bozdech Z. (2011). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is associated with an altered temporal pattern of transcription. *BMC Genomics*, 12, 391.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Mangui S, Richard-Lenoble D, Circoulon J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*. Paris: John Libbey Eurotext. 428 pp.
- Mueller I, Schoepflin S, Smith TA, Benton LK, Bretscher MT, Lin E, Kiniboro B, Zimmerman PA, Speed TP, Siba P, Felger I. (2012). Force of infection is key to understanding the epidemiology of

- Plasmodium falciparum* malaria in Papua New Guinean children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 10030-10035.
- Mueller I, Smith T, Moller S, Rare L, Genton B. (1998). The effect of distance from home on attendance at a small rural health center in Papua New Guinea. *International Journal of Epidemiology*, 27, 878-884.
- Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. (2007). *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the 'bashful' malaria parasites. *Trends in Parasitology*, 23, 278-283.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. . (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263-273.
- Murphy JR, Clyde DF, Herrington DA, Baqar S, Davis JR, Palmer K, Cortese J. (1990). Continuation of chloroquine-susceptible *Plasmodium falciparum* parasitemia in volunteers receiving chloroquine therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 676-679.
- Myint HY, Tipmanee P, Nosten F, Day NP, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ. (2004). A systematic overview of published antimalarial drug trials. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 73-81.
- Nair S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F, Anderson TJ. (2002). Rapid genotyping of loci involved in antifolate drug resistance in *Plasmodium falciparum* by primer extension. *International Journal of Parasitology*, 32, 852-858.
- Nakornchai S and Konthiang P. (2006). Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Acta Tropica*, 100, 185-191.
- Ndiaye D, Daily JP, Sarr O, Ndir O, Gaye O, Mboup S, Roper C, Wirth DF. (2006). Defining the origin of *Plasmodium falciparum* resistant *dhfr* isolates in Senegal. *Acta Tropica*, 99, 106-111.
- Nicoulet I, Simon F, Le Bras J. (1987). Apparition de chloroquinorésistance à *Plasmodium falciparum* en Côte-d'Ivoire. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 41, 163.
- Nkoghe D, Akue JP, Gonzalez JP, Leroy EM. (2011). Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. *Malaria Journal*, 10: 33.
- Nkrumah LJ, Riegelhaupt PM, Moura P, Johnson DJ, Haytone JPK, Ferdig MT, Wellems TE, Akabas MH, Fidock DA. (2010). Probing the multifactorial basis of *Plasmodium falciparum* quinine resistance: Evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger PfNHE. *Acta Tropica*, 113, 190-194.
- Noedl H, Krudsood S, Chalermratana K, Silachamroon U, Leowattana W, Tangpukdee N, Looareesuwan S, Miller RS, Fukuda M, Jongsakul K, Sriwichai S, Rowan J, Bhattacharya H, Oohet C, Knirsh C. (2006). Azythromycin combination therapy with artesunate or quinine for the treatment of

- uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in adults: a randomized, phase 2 clinical trial in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1264-1271.
- Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, Sokhna C, Pradines B, Cojean S, Guillotte M, Bischoff E, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Ariey F, Patarapotikul J, Le Bras J, Trape JF, Rogier C, Mercereau-Puijalon O. (2007). Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PloS One*, 2, e139.
- Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. (1995). Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52, 81-88.
- Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A, Millet P. (1997). *Plasmodium falciparum*: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Experimental Parasitology*, 87, 39-46.
- Ntoumi F, Ngoundou-Landji J, Luty AJ, Dubreuil G, Millet P. (2001). [Allelic polymorphism of *Plasmodium falciparum* MSP-2 gene in blood samples from Gabonese children]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 94, 183-187.
- Nzeyimana I, Somian A, Henry M-C, Gazin P, Assi S-B, Monjour L, Delmont J. (2006). Nosologie populaire des maladies infantiles dans l'Ouest de la Côte-d'Ivoire. Implications pour le paludisme. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 99, 129-134.
- Nzila A, Ochong E, Nduati E, Gilbert K, Winstanley P, Ward S, Marsh K. (2005). Why has the dihydrofolate reductase 164 mutation not consistently been found in Africa yet? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99, 341-346.
- Ochong EO, van den Broek IVF, Keus K, Nzila A. (2003). Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the *Chloroquine resistance transporter* gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69, 184-187.
- Ogutu B, Tiono AB, Makanga M, Premji Z, Badoé AD, Ubben D, Marrast AC, Gaye O. (2010). Treatment of asymptomatic carriers with artemether-lumefantrine: an opportunity to reduce the burden of malaria? *Malaria Journal*, 9, 1-7.
- Okombo J, Ohuma E, Picot S, Nzila A. (2011). Update on genetic markers of quinine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 177, 77-82.
- Ord R, Alexander N, Dunyo S, Hallett RL, Jawara M, Targett GAT, Drakeley CJ, Sutherland CJ. (2007). Seasonal carriage of *pfcr* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *Journal of Infectious Diseases*, 196, 1613-1619.
- Orostegui L, Balu L, Chevret L, Habes D, Pussard E. (2011). Community Management of Anti-malarials in Africa and Iatrogenic Risk. *Journal of Tropical Pediatrics*, 57, 225-226.

- Osman ME, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Elbashir MI, Giha HA. (2007). Field-based evidence for linkage of mutations associated with Chloroquine (PfCRT/PfMDR1) and sulfadoxine-pyrimethamine (PfDHFR/PfDHPS) résistance and for the fitness cost of multiple mutations in *P. falciparum*. *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 52-59.
- Ouattara L, Bla KB, Assi SB, Yavo W, Djaman AJ. (2010). PfCRT and DHFR-TS Sequences for Monitoring Drug Résistance in Adzopé Area of Côte d'Ivoire After the Withdrawal of Chloroquine and Pyrimethamine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Researches*, 9, 565.
- Packard, R. (1998). No other logical choice: Global malaria eradication and the politics of international health in the post war era. *Parassitologia*, 40, 217-229.
- Pearce RJ, Pota H, Evehe MSB, Bâ EH, Mombo-Ngoma G, Malisa AL, Ord R, Inojosa W, Matondo A, Diallo DA, Mbacham W, van den Broek IV, Swarthout TD, Getachew A, Dejene S, Grobusch MP, Njie F, Dunyo S, Kweku M, Owusu-Agyei S, Chandramohan D, Bonnet B, Guthman. (2009). Multiple Origins and Regional Dispersal of Resistant *dhps* in African *Plasmodium falciparum* Malaria. *Plos Medicine*, 6, e1000055.
- Penali KL, Koné M, Assi-Coulibaly L, Traore B, Lohoues-Yowell MO, Esse-Cadet M. (1990). La chloroquinorésistance in-vivo de *Plasmodium falciparum* chez le nourrisson et le jeune enfant dans l'agglomération d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *Médecine d'Afrique Noire*, 37, 9-12.
- Penali LK, Jansen FH. (2008). Single-day, three-dose treatment with fixed dose combination artesunate/sulfamethoxypyrazine/pyrimethamine to cure *Plasmodium falciparum* malaria. *International Journal of Infectious Diseases*, 12, 430-437.
- Penali LK, Faye O, Ndiaye JL, Toure-Offianan A, Faye B, Kuete T, Beugre Grah, Barro Kiki, Gaye O, Kone M, Same-Ekobo A. (2009). Etude comparative de l'efficacité et de la tolérance de l'association sulfalène/pyrimethamine versus l'association sulfadoxine/pyrimethamine dans le traitement du paludisme simple en zone d'endémie. *Sciences et Médecine d'Afrique*, 1, 75-80
- Peters W. (1970). *Chemotherapy and drug résistance in malaria*. 876 pp
- Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers résistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 9114-9118.
- Phyo AP, Nkhom S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Moo C, Salma A, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ, Anderson TJC, Nosten F. (2012). Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Science*, 336, 79-82.

- Pindolia DK, Garcia AJ, Wesolowski A, Smith DL, Buckee CO, Noor AM, Snow RW, Tatem AJ. (2012). Human movement data for malaria control and elimination strategic planning. *Malaria Journal*, *11*, 1-16.
- Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. (1997). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, *176*, 1590-1596.
- Plowe CV, Kublin JG, Doumbo OK. (1998). *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resistance Updates*, *1*, 389-396.
- Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, Meshnick SR, Mugittu K, Naidoo I, Price RN, Shafer RW, Sibley CH, Sutherland CJ, Zimmerman PA, Rosenthal PJ. (2007). World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. *Malaria Journal*, *6*, 1-10.
- Prao Kakou (2001). Evaluation de la chimiosensibilité de la chloroquine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum* en zone de savane ivoirienne (Korhogo et Niakaramadougou). Thèse Médecine Abidjan 108 pp
- Pukrittayakamee S, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ. (2004). Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in vivax malaria. *Acta Tropica*, *89*, 351-356.
- Ramharther M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp Iv, Bèlard S, Schlie M, Kammer J, Koumba PK, Cisse B, Mordmüller B, Lell B, Issifou S, Oeuvray C, Fleckenstein L, Kremsner PG. (2008). Fixed-dose pyronaridine artesunate combination for treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in pediatric patients in Gabon. *Journal of Infectious Diseases*, *198*, 911-919.
- Randford-Cartwright LC, Balfe P, Carter R, Walliker D. (1991). Genetic hybrids of *Plasmodium falciparum* identified by amplification of genomic DNA from single oocysts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *49*, 239-244.
- Raso G, Schur N, Utzinger J, Koudou BG, Tchicaya ES, Rohner F, N'Goran EK, Silué KD, Matthys B, Assi S, Tanner M, Vounatsou P. (2012). Mapping malaria risk among children in Cote d'Ivoire using Bayesian geo-statistical models. *Malaria Journal*, *11*, 1-11.
- Rawn, D. (1999). *Traité de Biochimie* (éd. 1ère édition). Deboeck Université. 1146 pp
- Rifakis PM, Hernandez O, Fernandez CT, Rodriguez-Morales AJ, Von A, Franco-Paredes C. (2008). Atypical *Plasmodium vivax* malaria in a traveler: bilateral hydronephrosis, severe thrombocytopenia, and hypotension. *Journal of Travel Medicine*, *15*, 119-112.

- Robert V, Boudin C. (2003). Biologie de la transmission homme - moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 6-20.
- Robert V, Sokhna CS, Rogier C, Ariey F, Trape JF. (2003). Sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. *Parasitology*, 127, 1-8.
- Rogier C, Henry M-C, Trape J-F. (2009). Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie. *Médecine Tropicale*, 69, 123-142.
- Rojo-Marcos G, Cuadros-Gonzalez J, Mesa-Latorre JM, Culebras-Lopez AM, DePablo-Sanchez R. (2008). Acute respiratory distress syndrome in a case of *Plasmodium ovale* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 391-393.
- Ronaghi M, Elahi E. (2002). Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by pyrosequencing. *Computational and functional genomics*, 3, 51-56.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal of Biochemistry*, 242, 84-89.
- Ronaghi, M. (2000). Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal of Biochemistry*, 286, 282-288.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Researches*, 11, 3-11.
- Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. (2004). Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*, 305, 1124.
- Rovira-Graells N, Gupta AP, Planet E, Crowley VM, Mok S, Ribas de Pouplana L, Preiser PR, Bozdech Z, Cortés A. (2012). Transcriptional variation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Researches*, 22, 925-38.
- Rozé B, Lambert Y, Gelin E, Geffroy F, Hutin P. (2011). Gravité du paludisme à *Plasmodium ovale*. *Médecine et maladies infectieuses*, 41,216-217.
- Rueangweerayut R, Phy AP, Uthaisin C, Poravuth Y, Binh TQ, Tinto H, Pénali LK, Valecha N, Tien NT, Abdulla S, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin C-S, Fleckenstein L. (2012). Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *New England Journal of Medicine*, 366, 1298-1309.
- Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. (2010). Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 40, 1109-1118.
- Segel IH, Renosto F, Seubert PA. (1987). Sulfate-activating enzymes. *Methods in Enzymology*, 143, 334-49.
- Siau A, Silvie O, Franetich J F, Yalaoui S, Marinach C, Hannoun L, van Gemert G J, Luty A J, Bischoff E, David P H, Snounou G, Vaquero C, Froissard P, Mazier D. (2008). Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLoS Pathogens*, 4:e1000121.

- Sibley CH, Ringwald P. (2006). A database of antimalarial drug resistance. *Malaria Journal*, 5, 1-9.
- Silué KD, Felger I, Utzinger J, Beck HP, Smith TA, Tanner M, N'Goran EK. (2006). Prevalence, genetic diversity and multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in school children in central Cote d'Ivoire. *Médecine Tropicale*, 66, 149-156.
- Sinden, R. (1998). Gametocytes and sexual development. In S. IW (Ed.), *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington DC: American Society for Microbiology Press. (25-48 pp).
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363, 1017-1024.
- Sisowath C, Peterson I, Veiga MI, Martensson A, Premji Z, Björkman A, Fidock DA, Gil JP, 2009. in vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfcrk76* allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *Journal of Infectious Diseases* 199, 750-757.
- Smith T, Felger I, Kitua A, Tanner M, Beck HP. (1999). Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93, 35-39.
- Snedecor GW and Cochran WG. (1989). *Statistical methods* (8th Edition ed.). Ames: Iowa State University Press. 503 pp
- Sopitthummakhun K, Thongpanchang C, Vilaivan T, Yuthavong Y, Chaiyen P, Leartsakulpanich U. (2012). *Plasmodium* serine hydroxymethyltransferase as a potential anti-malarial target: inhibition studies using improved methods for enzyme production and assay. *Malaria Journal*, 11, 1-12.
- Souares A, Moulin P, Sarrassat S, Carlotti MP, Lalou R, Le Hesran JY. (2009). Self-reported data: a major tool to assess compliance with anti-malarial combination therapy among children in Senegal. *Malaria Journal*, 8, 1-7.
- Soulama I, Bigoga JD., Ndiaye M, Bougouma EC., Quagraine J, Casimiro PN, Stedman TT., Sirima SB. (2011). Genetic Diversity of Polymorphic Vaccine Candidate Antigens (Apical Membrane Antigen-1, Merozoite Surface Protein-3, and Erythrocyte Binding Antigen-175) in *Plasmodium falciparum* isolates from western and central Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 201.
- Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, Bougouma EC, Konaté AT, Kabré GB, Taylor WRJ and Sirima SB. (2009). *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malaria Journal*, 8, 1-8.
- Sridaran S, McClintock S, Syphard L, Herman K, Barnwell J, Udhayakumar V. (2010). Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (*dhfr*) and dihydropteroate

- synthase (*dhps*) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malaria Journal*, 9, 1-22.
- Staines HM, Alkhalil A, Allen RJ, De Jonge HR, Derbyshire E, Egée S, Ginsburg H, Hill DA, Huber SM, Kirk K, Lang F, Lisk G, Oteng E, Pillai AD, Rayavara K, Rouhani S, Saliba KJ, Shen C, Solomon T, Thomas SL, Verloo P, Desai SA. (2007). Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *International Journal of Parasitology*, 37, 475-82.
- Staines HM, Ellory JC, Kirk K. (2001). Perturbation of the pump-leak balance for Na (+) and K (+) in malaria-infected erythrocytes. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 280, C1576-C1587.
- Sturn A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. (2006). Manipulation of host hepatocytes by malaria parasites for delivery into sinusoids. *Science*, 313, 1287-1290.
- Sutherland CJ, Drakeley CJ, Schellenberg D. (2007). How is childhood development of immunity to *Plasmodium falciparum* enhanced by certain antimalarial interventions? *Malaria Journal*, 6, 1-4.
- Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ, bin Reza F, Nicholas M, Haustein T, Njimgye-Tekumafor NE, Doherty JF, Gothard P, Polley SD, Chiodini PL. (2009). Novel *pf dhps* haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53, 3405-3410.
- Tahar R, Basco LK. (2007). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXVI. Twelve-year in vitro and molecular surveillance of pyrimethamine resistance and experimental studies to modulate pyrimethamine resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 221-227.
- Takala SL, Smith DL, Stine OC, Coulibaly D, Thera MA, Doumbo OK, Plowe CV. (2006). A high-throughput method for quantifying alleles and haplotypes of the malaria vaccine candidate *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 19kDa. *Malaria Journal*, 5, 1-10.
- Tatem AJ, Smith DL. (2010). International population movements and regional *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 12222-12227.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, Dicko A, Diemert DJ, Heppner DG Jr, Stewart VA, Angov E, Soisson L, Leach A, Tucker K, Lyke KE, Plowe CV; Mali FMP1 Working Group. (2006). Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine and allele-specific immunogenicity in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clinical Trials*, 1, e34.
- Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, Traore K, Garba MN, Cissoko Y, Kone A, Guindo A, Dicko A, Beavogui AH, Djimde AA, Lyke KE, Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV. (2005). Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on *falciparum* malaria infection and disease. *Journal of Infectious Diseases*, 5, 1823-1829.

- Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemde RT, D'Allessandro U, Ouedraogo JB. (2008). Chloroquine-résistance molecular markers (*pfcr* T76 and *pfmdr-1*) and Amodiaquine résistance in Burkina-Faso. *Tropical Medicine and International Health*, 13, 238-240.
- Tinto H, Ouédraogo JB, Zongo I, van Overmeir C, van Marck E, Guiguemdé TR, D'Alessandro U. (2007). Sulfadoxine-pyrimethamine efficacy and selection of *Plasmodium falciparum* DHFR mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 608-613.
- Touré AO, Penali KL, Jambou R, Konan TD, Demba S, Beugre GE, Koné M. (2008). Sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la quinine, l'artésunate et la chloroquine à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Cahiers Santé*, 18, 43-47.
- Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*, 7, 315-323.
- Triglia T, Cowman AF. (1994). Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 7149-7153.
- Triglia T, Menting JGT, Wilson C, Cowman AF. (1997). Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide résistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 94, 13944-13949.
- Triglia T, Wang P, Sims PF, Hyde JE, Cowman AF. (1998). Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO Journal*, 17, 3807-3815.
- Tsumori Y, Ndounga M, Sunahara T, Hayashida N, Inoue M, Nakazawa S, Casimiro P, Isozumi P, Uemura H, Tanabe K, Kaneko O, Culleton R. (2011). *Plasmodium falciparum*: Differential Selection of Drug Résistance Alleles in Contiguous Urban and Peri-Urban Areas of Brazzaville, Republic of Congo. *Plos One*, 6, e23430.
- Valderramos SG, Valderramos JC, Musset L, Purcell LA, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock DA. (2010). Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 6, e1000887.
- van Agtmael, MA, Eggelte TA, van Boxtel CJ. (1999). Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 199-205.
- van Oosterhout, Joep JG, Laufer MK, Graham SM, Thumba F, Perez MA; Chimbiya N, Wilson L, Chagomerana M, Molyneux M, Zijlstra EE, Taylor, Terrie EDO, Plowe CV. (2011). A Community-Based Study of the Incidence of Trimethoprim-Sulfamethoxazole-Preventable Infections in Malawian Adults Living With HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 39, 626-631.

- Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, Zalis MG. (2000). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Memoria of Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 721-728.
- Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Alam T, Mixson-Hayden T, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Ariey F, Meshnick SR, Udhayakumar V. (2010). Origin and Evolution of Sulfadoxine Resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 6, e1000830.
- Volkman S, Neafsey DE, Schaffner SF, Park DJ, Dyann FW. (2012). Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nature Reviews, Genetics*, 13, 315-328.
- Vythilingam, I. (2010). *Plasmodium knowlesi* in humans: a review on the role of its vectors in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 27, 1-12.
- Wahlberg J, Holmberg A, Bergh S, Hultman T, Uhlén M. (1992). Automated magnetic preparation of DNA templates for solid phase sequencing. *Electrophoresis*, 13, 547-551.
- Walliker D, Hunt P, Babiker H. (2005). Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Tropica*, 94, 251-259.
- Warhurst, D. C. (2002). Résistance to antifolates in *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. *Science Progress*, 85, 89-111.
- Watkins WM, Mosobo M. (1993). Treatment of *Plasmodium falciparum* with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for résistance is a function of long elimination half-life. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 75-78.
- Wellems TE, Plowe CV. (2001). Chloroquine-resistant malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 184, 770-776.
- Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. (2009). New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 879-891.
- White NJ, Pongtavornpinyo W. (2003). The *de novo* selection of drug-resistant malaria parasites. *Proceedings Biological Sciences*, 270, 545-554.
- White NJ, Pongtavornpinyo W, Maude RJ, Saralamba S, Aguas R, Stepniewska K, Lee SJ, Dondorp AM, White LJ, Day NP. (2009). Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug résistance. *Malaria Journal*, 8, 1-18.
- White, N. (2004). Antimalarial drug résistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 1084-1092.
- WHO. (2003). *Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria*. Geneva: World Health Organization. WHO/HTM/RBM/2003.50. 68 pp.
- WHO. (1973). *Chemotherapy of malaria and résistance to antimalarials*. WHO Technical Report Series. Report of a WHO Scientific Group. (WHO Technical Report Series, No. 529).

- WHO. (2009b). Defining and validating a measure of parasite resistance to sulfadoxine-pyrimethamine (SP) that would be indicative of the protective efficacy of SP for intermittent preventive treatment in infancy (SP-IPTi). Geneva: World Health Organization. Report of the technical consultation. 8 pp
- WHO. (1965). *Résistance of malaria parasites to drugs*. Report of a WHO scientific group, World Health Organization, Geneva. (WHO Technical Report Series, No. 296).
- Wiktor SZ, Sassan-Morokro M, Grant AD, Abouya L, Karon JM, Maurice C, Djomand G, Ackah A, Domoua K, Kadio A, Yapi A, Combe P, Tossou O, Roels TH, Lackritz EM, Coulibaly D, De CK, Coulibaly IM, Greenberg AE. (1999). Efficacy of trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1-infected patients with tuberculosis in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomized controlled trial. *Lancet*, 353, 1469-1475.
- Willems, S. (2006). *The Ivorian pineapple: Social action within the international pineapple commodity network*. Thesis, Wageningen. 192 pp
- 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, 320-3.
- World Health Organization. (1996). *Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated malaria in areas with intense transmission*. Geneva: World Health Organization.
- Wurtz N, Lekweiry KM, Bogreau H, Pradines B, Rogier C, Boukhary AOMS, Hafid JE, Salem MSOA, Trape JF, Basco LK, Briolant S. (2011). *Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual*. *Malaria Journal*, 10, 1-8.
- Yang Z, Li C, Miao M, Zhang Z, Sun X, Meng H, Li J, Fan Q, Cui L. (2011). Multidrug-resistant genotypes of *Plasmodium falciparum*, Myanmar. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 498 - 501.
- Yangni-Angaté, A. (2005). Les bases socioculturelles de la médecine traditionnelle. In Y.-A. Antoine, *La revalorisation de la médecine traditionnelle africaine en Côte-d'Ivoire*. (p. 182). Abidjan: CEDA.
- Yavo W, Menan EI, Adjetei TA, Barro-Kiki PC, Nigué L, Konan YJ, Nebavi NG, Koné M. (2002). In vivo sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amino-4-quinolines and sulfadoxine pyrimethamine in Agou (Ivory Coast). *Pathology Biology*, 50, 184-188.
- Young MD, Contacos PG, Stitche JE, Millar JW. (1963). Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12, 305-314.
- Zhou Z, Griffing SM, de Oliveira AM, McCollum AM, Quezada WM, Arrospe N, Escalante AA, Udhayakumar V. (2008). Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52, 739-741.
- Zhou Z, Poe AC, Limor J, Grady KK, Goldman I, McCollum AM, Escalante AA, Barnwell JW, Udhayakumar V. (2006). Pyrosequencing, a high-throughput method for detecting single nucleotide

polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3900-3910.

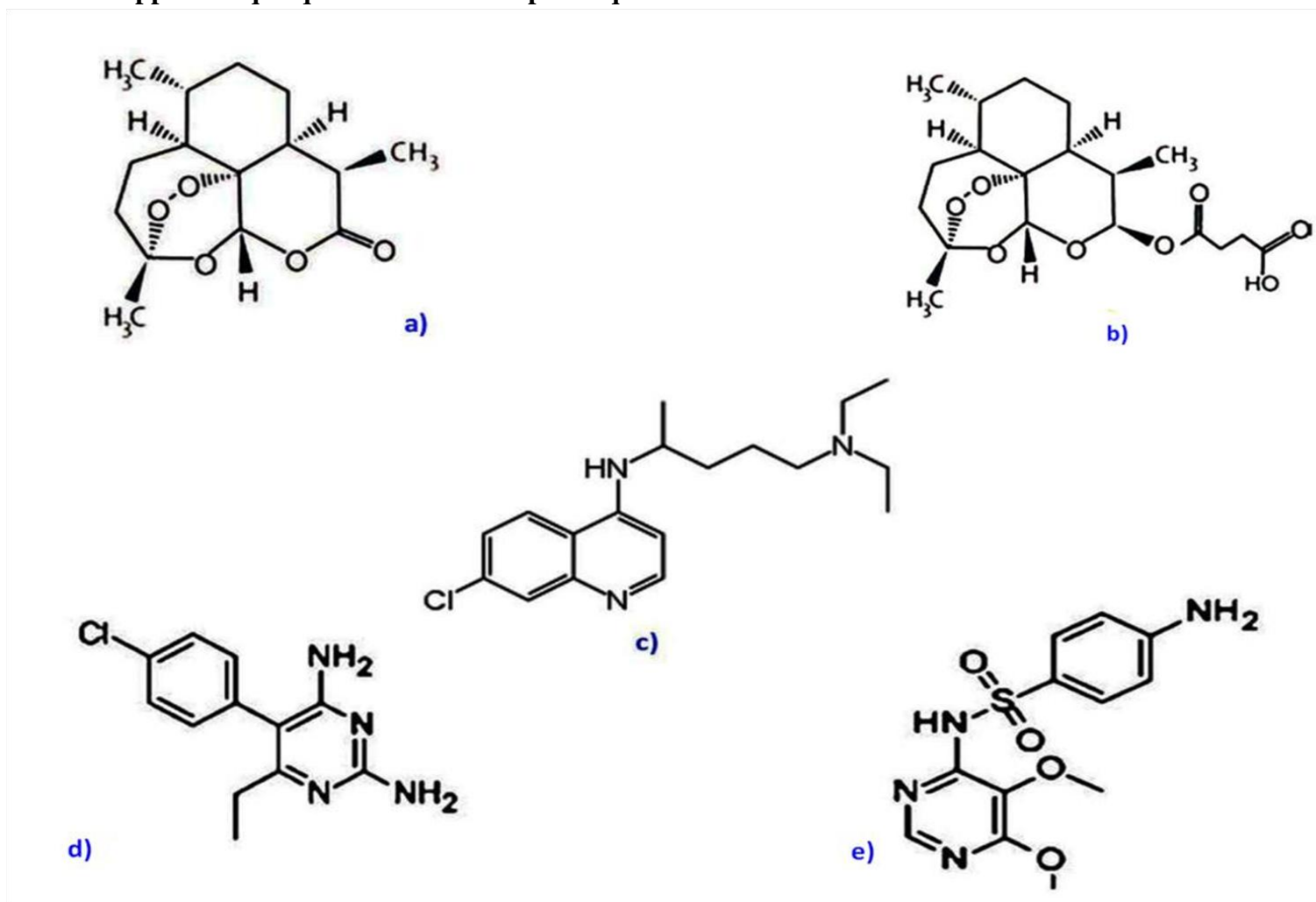
Zoguereh DD, Delmont J. (2000). Antimalarial drugs and their ways to use in the African milieu. *Santé*, 10, 425-433.

Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, Guiguemde RT, Rosenthal PJ, Ouedraogo JB. (2007). Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Burkina Faso: a randomized non-inferiority trial. *Lancet*, 369, 491-498.

Zur Wiesch PA, Kouyos R, Engelstadter J, Regoes RR, Bonhoeffer S. (2011). Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *Lancet Infectious Diseases*, 11, 236-47.

ANNEXES

Annexe 1: Formules développées de quelques molécules antipaludiques usuels



(a) Artémisinine, (b) Artesunate, (c) Chloroquine, (d) pyriméthamine, (e) Sulfadoxine

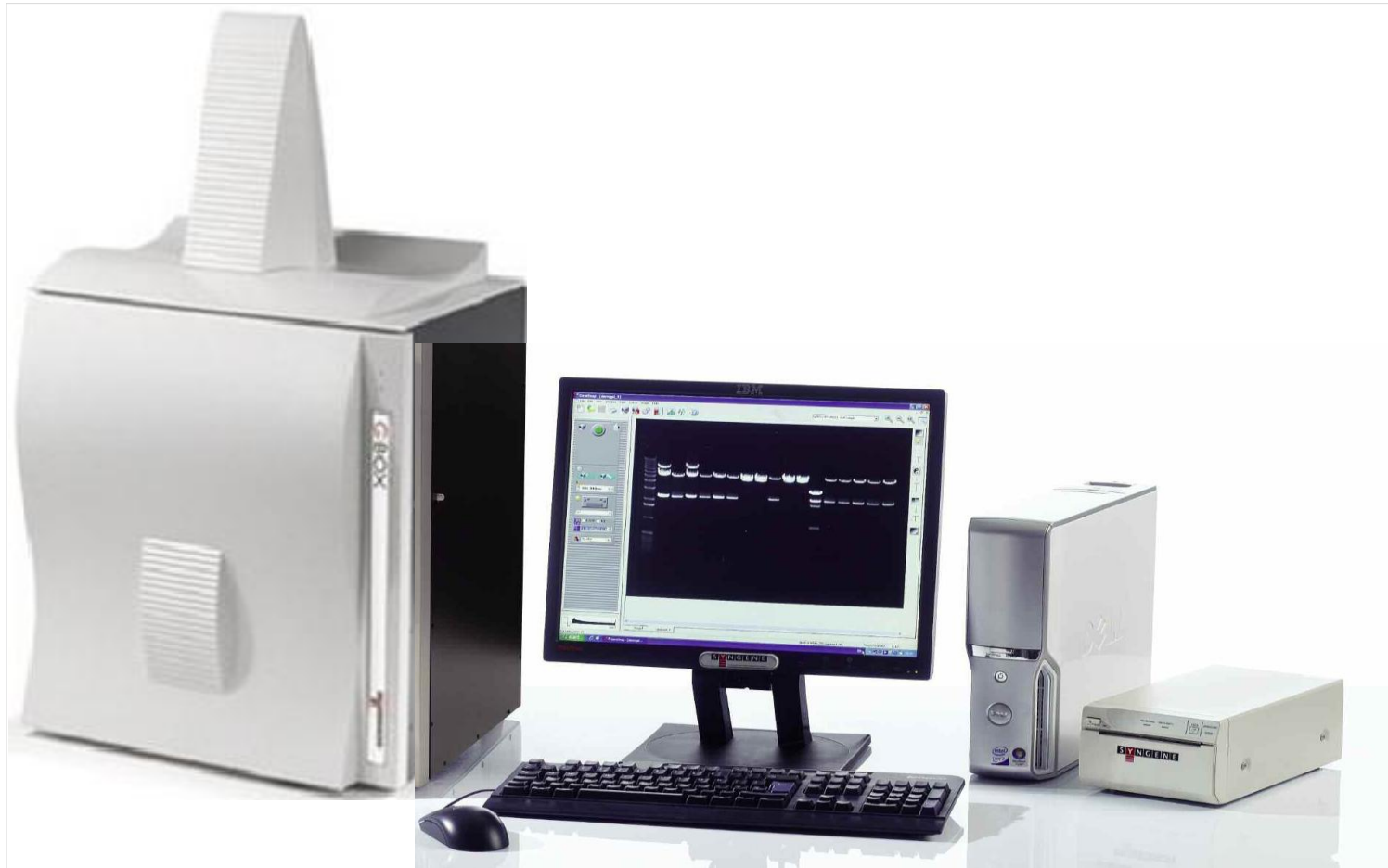
Annexe 2 : Composition de milieux réactionnels pour les amplifications d'ADN extrait d'isolat issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques.

Amplification	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes (µL)
PCR-Primaire				
	H ₂ O stérile			7,4
	<i>Failsafe™ PCR Premix A</i>	5 X	1 X	10,0
	Amorce (5')	25 mM	10 mM	0,2
	Amorce (3')	25 mM	10 mM	0,2
	<i>Failsafe™ PCR Enzyme Mix</i>	2,5 U/µL	0,5 U/µL	0,2
	Template DNA			2,0
	<i>Volume final</i>			<i>20,0</i>
PCR-nichée				
	H ₂ O stérile			8,5
	<i>Failsafe™ PCR Premix A</i>	5 X	1 X	10,0
	Amorce (5')	25 mM	10 mM	0,4
	Amorce (3')	25 mM	10 mM	0,4
	<i>Failsafe™ PCR Enzyme Mix</i>	2,5 U/µL	0,5 U/µL	0,2
	Produit PCR primaire			0,5
	<i>Volume final</i>			<i>20,0</i>
Amplification de Séquençage				
	H ₂ O stérile			4,5
	<i>Failsafe™ PCR Premix A</i>	5 X	5 X	1,70
	Amorce (5' ou 3')	25 mM	10 mM	0,8
	BigDye®	2,5 U/µL	0,5 U/µL	1,0
	Produit PCR-nichée			2,0
	<i>Volume final</i>			<i>10,0</i>

Annexe 3 : Programme des amplifications par PCR et de séquençage de l'ADN extrait d'isolat issus d'individus asymptomatiques et de patients symptomatiques.

Nom du programme	Programme d'amplifications	Gènes
MARNIE	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C x 3 min >>> Dénaturation initiale 2. 94 °C x 30 sec >>> Dénaturation 3. 50 °C x 45 sec >>> Hybridation 4. 72 °C x 1 min >>> Élongation 5. 30 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 10 min >>> Élongation finale 7. 4°C>>> Infini 	<i>pfhfr</i>
PFDHPS	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C x 3 min>>> Dénaturation initiale 2. 94 °C x 45 sec >>> Dénaturation 3. 51 °C x 45 sec >>> Hybridation 4. 60 °C x 45 sec >>> Élongation 5. 34 fois à partir de l'étape 2 6. 60 °C x 5 min >>> Élongation finale 7. 4 °C>>> Infini 	<i>pfhps</i>
PFCRT	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C x 3 min >>> Dénaturation initiale 2. 94 °C x 30 sec >>> Dénaturation 3. 56 °C x 30 sec >>> Hybridation 4. 62 °C x 1 min >>> Élongation 5. 34 fois à partir de l'étape 2 6. 62 °C x 5 min >>> Élongation finale 7. 15 °C x 5 min >>> Incubation 8. 4 °C>>> Infini 	<i>pfcr</i>
SEQ	<ol style="list-style-type: none"> 1. 96 °C x 10 sec >>> Dénaturation initiale 2. 96 °C x 10 sec >>> Dénaturation 3. 50 °C x 5 sec >>> Hybridation 4. 60 °C x 4 min >>> Extension. 5. 24 fois à partir de l'étape 2 6. Fin 	<i>pfhfr pfhps pfcr</i>

Annexe 4: System G: BOX BioImaging (Syngene Inc.)



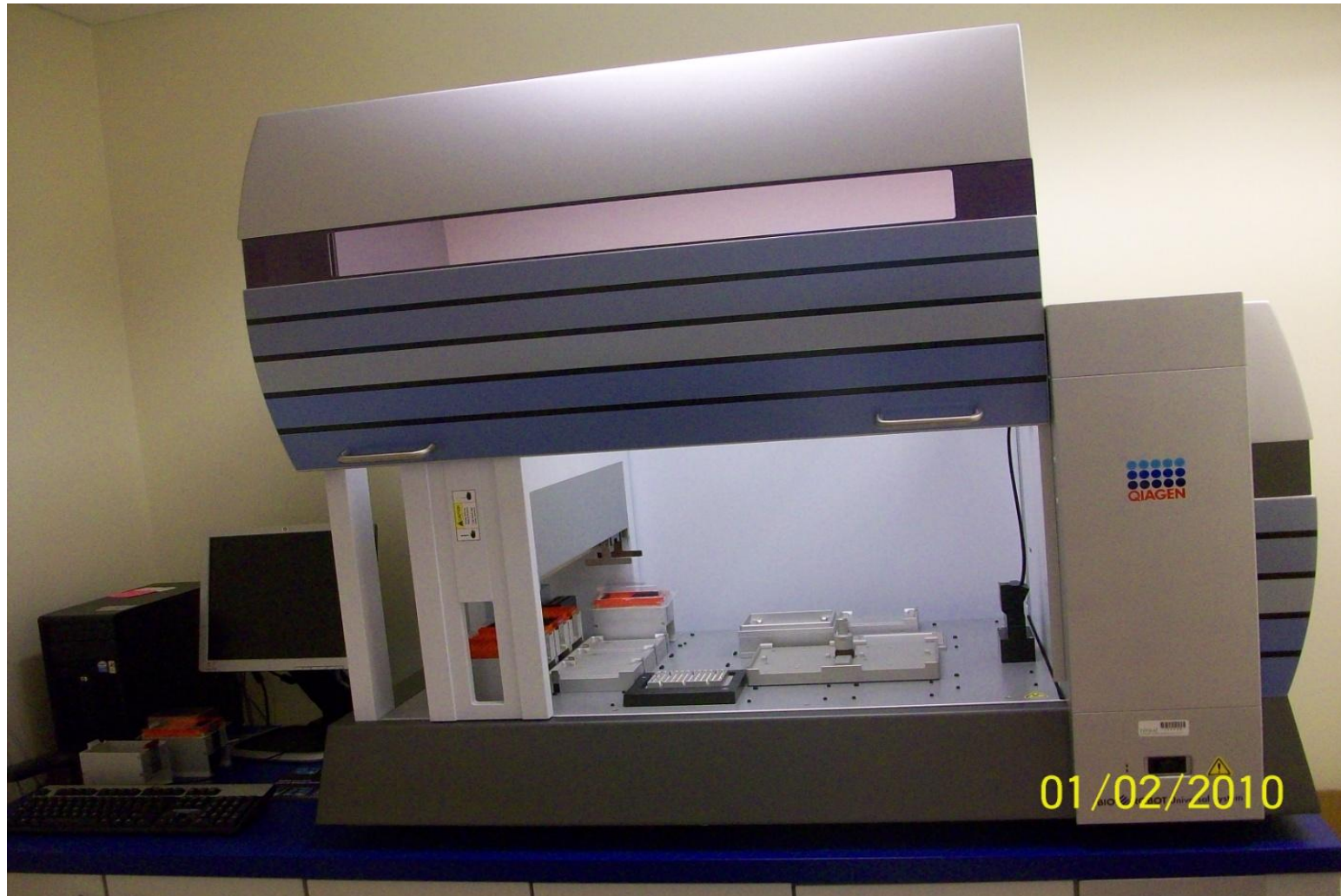
Annexe 5 : Plans de 9 microplaques 96 puits utilisés pour l'extraction et la purification d'ADN génomique

Plaque-1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4-11010-ECHEC	4-SCR 005	4-SCR 014	4-SCR 022	4-SCR 031	4-SCR 039	4-SCR 047	4-SCR 055	4-SCR 063	4-SCR 071	4-SCR 079	38JOB
B	4-11775-ECHEC	4-SCR 006	4-SCR 015	4-SCR 023	4-SCR 032	4-SCR 040	4-SCR 048	4-SCR 056	4-SCR 064	4-SCR 072	4-SCR 080	28JOB
C	4-11784-ECHEC	4-SCR 007	4-SCR 016	4-SCR 025	4-SCR 033	4-SCR 041	4-SCR 049	4-SCR 057	4-SCR 065	4-SCR 073	4-SCR 081	09JOB
D	4-11791-ECHEC	4-SCR 008	4-SCR 017	4-SCR 026	4-SCR 034	4-SCR 042	4-SCR 050	4-SCR 058	4-SCR 066	4-SCR 074	4-SCR 082	12JOB
E	4-SCR 001	4-SCR 009	4-SCR 018	4-SCR 027	4-SCR 035	4-SCR 043	4-SCR 051	4-SCR 059	4-SCR 067	4-SCR 075	31JOB	
F	4-SCR 002	4-SCR 010	4-SCR 019	4-SCR 028	4-SCR 036	4-SCR 044	4-SCR 052	4-SCR 060	4-SCR 068	4-SCR 076	24JOB	
G	4-SCR 003	4-SCR 012	4-SCR 020	4-SCR 029	4-SCR 037	4-SCR 045	4-SCR 053	4-SCR 061	4-SCR 069	4-SCR 077	03JOB	
H	4-SCR 004	4-SCR 013	4-SCR 021	4-SCR 030	4-SCR 038	4-SCR 046	4-SCR 054	4-SCR 062	4-SCR 070	4-SCR 078	34JOB	
Plaque 1: Pyramax_Anonkoua-koute 2008 (84 echantillons); ASAQ_Bonoua Sept-Nov 2006 (8 echantillons)												
Plaque-3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	143	204	213	227	235	247	259	269	278	289	297	309
B	144	205	215	228	236	249	260	270	279	290	301	310
C	145	206	221	229	237	250	261	271	280	291	302	311
D	146	314	222	230	239	251	268	272	281	292	304	312
E	147	208	223	231	241	252	263	273	282	293	305	
F	201	210	224	232	244	253	264	410	283	294	306	
G	202	211	225	233	245	256	266	276	284	295	307	
H	203	212	226	234	246	258	267	277	288	296	308	
Plaque 3 : Quinimax_San Pedro 2002-03 (5 echantillons); Quinimax_Anonkoua-koute 2002-03 (87 echantillons)												
Plaque 4												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	313	407	425	434	442	455	466	475	DA06	DA14	DA22	DA30
B	315	416	426	435		457	467	476	DA07	DA15	DA23	DA31
C	316	418	427	436	445	458	468	477	DA08	DA16	DA24	DA32
D	317	419	428	437	446	459	469	478	DA09	DA17	DA25	DA33
E	318	420	430	438	447	462	470	479	DA10	DA18	DA26	
F	319	421	431	439	448	463	471	DA01	DA11	DA19	DA27	
G	405	422		440	450	464	472	DA03	DA12	DA20	DA28	
H	406	424	433	441	451	465	474	DA04	DA13	DA21	DA29	
Plaque 4 : Quinimax_Anonkoua-koute 2002-03 (59 echantillons); ASAQ_Dabakala 2008-09 (31 echantillons)												

Plaque 5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DA34	DA42	DA50	DA58	DA66	DA74	DA82	DA90	DA98	DA106	DA115	DA123
B	DA35	DA43	DA51	DA59	DA67	DA75	DA83	DA91	DA99	DA107	DA116	DA124
C	DA36	DA44	DA52	DA60	DA68	DA76	DA84	DA92	DA100	DA108	DA117	DA125
D	DA37	DA45	DA53	DA61	DA69	DA77	DA85	DA93	DA101	DA109	DA118	DA126
E	DA38	DA46	DA54	DA62	DA70	DA78	DA86	DA94	DA102	DA111	506	
F	DA39	DA47	DA55	DA63	DA71	DA79	DA87	DA95	DA103	DA112	DA120	
G	DA40	DA48	DA56	DA64	DA72	DA80	DA88	DA96	DA104	DA113	DA121	
H	DA41	DA49	DA57	DA65	DA73	DA81	DA89	DA97	DA105	DA114	DA122	
Plaque 5 : ASAQ_Dabakala 2008-09 (91 echantillons); Quinimax_Anoukoua-koute 2002-03 (1 echantillon)												
Plaque-6												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DA 127	DA 135	DA 143	7	17	24	32	40	48	65	85	95
B	DA 128	DA 136	DA 144	8	18	25	33	41	49	66	86	96
C	DA 129	DA 137	DA 145	10	19	26	34	42	50	135	87	DIA 23
D	DA 130	DA 138	1	11	20	27	35	43	60	67	89	98
E	DA 131	DA 139	2	12	21	28	36	44	61	70	91	
F	DA 132	DA 140	3	13	22	29	37	45	62	71	92	
G	DA 133	DA 141	4	16	23	30	38	46	63	72	94	
H	DA 134	DA 142	5	133	134	31	39	47	64	76	DIA 21	
Plaque 6 : ASAQ_Dabakala 2008-09 (19 echantillons); ASAQ_Ayame 2008-09 (73 echantillons)												
Plaque-9												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	99	109	117	127	161	169	177	185	107	115	130	139
B	100	110	118	128	162	170	178	104	108	116	131	140
C	101	111	119	129	164	171	179	187	109	117	132	141
D	104	112	120	130	163	172	180	101	110	125	133	142
E	105	113	121	149	165	173	181	102	111	126	134	
F	131	114	123	136	166	174	182	103	112	148	135	
G	106	115	124	158	167	175	183	106	113	128	138	
H	108	116	125	160	168	176	184	186	114	129	255	
Plaque 9 : Quinimax_San Pedro 2002-03 (63 echantillons); ASAQ_Ayame 2008-09 (28 echantillons); Quinimax_Anoukoua-koute 2002-03 (1 echantillon)												

Plaque-12												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ANK0506_1	ANK0506_2	ANK0506_3	ANK0506_4	ANK0506_5	ANK0506_6	ANK0506_7	ANK0506_8	ANK0506_9	ANK0506_10	ANK0506_11	ANK0506_12
B	ANK0506_13	ANK0506_14	ANK0506_15	ANK0506_16	ANK0506_17	ANK0506_18	ANK0506_19	ANK0506_20	ANK0506_21	ANK0506_22	ANK0506_23	ANK0506_24
C	ANK0506_51	ANK0506_52	ANK0506_53	ANK0506_54	ANK0506_55	ANK0506_56	ANK0506_57	ANK0506_58	ANK0506_59	ANK0506_60	ANK0506_61	ANK0506_62
D	ANK0506_63	ANK0506_64	ANK0506_65	ANK0506_66	ANK0506_67	ANK0506_68	ANK0506_69	ANK0506_70	ANK0506_71	ANK0506_72	ANK0506_73	ANK0506_74
E	ANK0506_101	ANK0506_102	ANK0506_103	ANK0506_104	ANK0506_105	ANK0506_106	ANK0506_107	ANK0506_108	ANK0506_109	ANK0506_110	ANK0506_111	
F	ANK0506_112	ANK0506_113	ANK0506_114	ANK0506_115	ANK0506_116	ANK0506_117	ANK0506_118	ANK0506_119	ANK0506_120	ANK0506_121	ANK0506_122	
G	ANK0506_123	ANK0506_124	ANK0506_151	ANK0506_152	ANK0506_153	ANK0506_154	ANK0506_155	ANK0506_156	ANK0506_157	ANK0506_158	ANK0506_159	
H	ANK0506_160	ANK0506_161	ANK0506_162	ANK0506_163	ANK0506_164	ANK0506_165	ANK0506_166	ANK0506_167	ANK0506_168	ANK0506_169	ANK0506_170	
Plaque 12: Anonkoua-koute 2005-06 (92 echantillons)												
Plaque-13												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ANK0506_171	ANK0506_172	ANK0506_173	ANK0506_174	ANK0506_200	ANK0506_201	ANK0506_202	ANK0506_203	ANK0506_204	ANK0506_205	ANK0506_206	ANK0506_207
B	ANK2007_1	ANK2007_4	ANK2007_5	ANK2007_6	ANK2007_7	ANK2007_8	ANK2007_9	ANK2007_10	ANK2007_11	ANK2007_12	ANK2007_15	ANK2007_16
C	ANK2007_19	ANK2007_20	ANK2007_21	ANK2007_22	ANK2007_24	ANK2007_54	ANK2007_26	ANK2007_27	ANK2007_28	ANK2007_29	ANK2007_31	ANK2007_32
D	ANK2007_33	ANK2007_35	ANK2007_36	ANK2007_40	ANK2007_42	ANK2007_43	ANK2007_44	ANK2007_45	ANK2007_46	ANK2007_47	ANK2007_55	ANK2007_56
E	ANK2007_57	ANK2007_58	ANK2007_59	ANK2007_60	ANK2007_61	ANK2007_62	ANK2007_63	ANK2007_65	ANK2007_67	ANK2007_68	ANK2007_69	
F	ANK2007_70	ANK2007_71	ANK2007_72	ANK2007_73	ANK2007_74	ANK2007_75	ANK2007_76	ANK2007_77	ANK2007_78	ANK2007_79	ANK2007_80	
G	ANK2007_82	ANK2007_83	ANK2007_84	ANK2007_85	ANK2007_86	ANK2007_87	ANK2007_88	ANK2007_89	ANK2007_90	ANK2007_91	ANK2007_92	
H	ANK2007_93	ANK2007_94	ANK2007_96	ANK2007_100	ANK2007_101	ANK2007_102	ANK2007_103	ANK2007_104	ANK2007_105	ANK2007_106	ANK2007_108	
Plaque 13: Anonkoua-koute 2005-06 (12 echantillons) + Anonkoua-koute 2007 (80 echantillons)												
Plaque-14												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ANK2007_109	ANK2007_110	ANK2007_113	ANK2007_114	ANK2007_115	ANK2007_116	ANK2007_117	ANK2007_119	ANK2007_121	ANK2007_122	ANK2007_123	ANK2007_136
B	ANK2007_137	ANK2007_138	ANK2007_139	ANK2007_140	ANK2007_141	ANK2007_142	ANK2007_143	ANK2007_152	ANK2007_153	ANK2007_154	ANK2007_155	ANK2007_156
C	ANK2005_46	ANK2005_47	ANK2005_48	ANK2005_49	ANK2005_51	ANK2005_52	ANK2005_53	ANK2005_54	ANK2005_57	ANK2005_59	ANK2005_60	ANK2005_62
D	ANK2005_64	ANK2005_65	ANK2005_66	ANK2005_67	ANK2005_68	ANK2005_70	ANK2005_71	ANK2005_72	ANK2005_73	ANK2005_74	ANK2005_75	ANK2005_76
E	ANK2005_78	ANK2005_79	ANK2005_80	ANK2005_82	ANK2005_83	ANK2005_87	ANK2005_89	ANK2005_90	ANK2005_92	ANK2005_94	ANK2005_95	
F	ANK2005_96	ANK2005_97	ANK2005_98	ANK2005_99	ANK2005_101	ANK2005_102	ANK2005_103	ANK2005_104	ANK2005_105	ANK2005_107	ANK2005_108	
G	ANK2005_109	ANK2005_110	ANK2005_111	ANK2005_112	ANK2005_113	ANK2005_114	ANK2005_115	ANK2005_117	ANK2005_119	ANK2005_120	ANK2005_122	
H	ANK2005_123	ANK2005_124	ANK2005_125	ANK2005_127	ANK2005_131	ANK2005_132	ANK2005_133	ANK2005_134	ANK2005_135	ANK2005_136	ANK2005_137	
Plaque 14: Anonkoua-koute 2007 (24 echantillons) + Anonkoua-koute 2005 (68 echantillons)												

Annexe 6: *BioRobot® Universal System Qiagen®*



Vue d'ensemble du système d'extraction et de purification d'ADN *BioRobot® Universal System* de Qiagen®
(Photo :AKO Bérenger)

Annexe 7 : Composition des milieux réactionnels pour les amplifications par PCR des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfprt*.

Gènes	Amplification	Réactifs	Concentrations d'origine	Concentrations finales	Volume (µl)
<i>pfdhfr</i> ou <i>pfdhps</i>	PCR primaire et	Eau stérile			10,95
		Tampon 10X	10X	1X	2,5
	Nested-PCR	dNTP	20 mM	0,16 mM	0,25
		MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2
		Amorce EF (Sec XF)	50 µM	0,5 µM	4
		Amorce ER (Sec XR)	50 µM	0,5 µM	4
		Taq Poly	5 U/µl	0,05 U/µl	0,3
		ADN			1
	<i>Volume final</i>			25	
<i>pfprt</i>	PCR primaire	Eau stérile			16,95
		Tampon 10X	10X	1X	2,5
		dNTP	20 mM	0,2 mM	0,25
		MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
		Amorce EF	5 µM	0,2 µM	1
		Amorce ER	5 µM	0,2 µM	1
		Taq Poly	5 U/µl	0,05 U/µl	0,3
		ADN			1
		<i>Volume final</i>			25
	Nested PCR	Eau stérile			10,95
		Tampon 10X	10X	1X	2,5
		dNTP	20 mM	0,2 mM	0,25
		MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
Amorce IF		5 µM	0,8 µM	4	
	Amorce IR	5 µM	0,8 µM	4	
	Taq Poly	5 U/ µl	0,05 U/µl	0,3	
	Produit PCR primaire			1	
	<i>Volume final</i>			25	

Annexe 8. Programmes d'amplification primaire pour les gènes *pfprt*, *pfdhfr* et *pfdhps*.

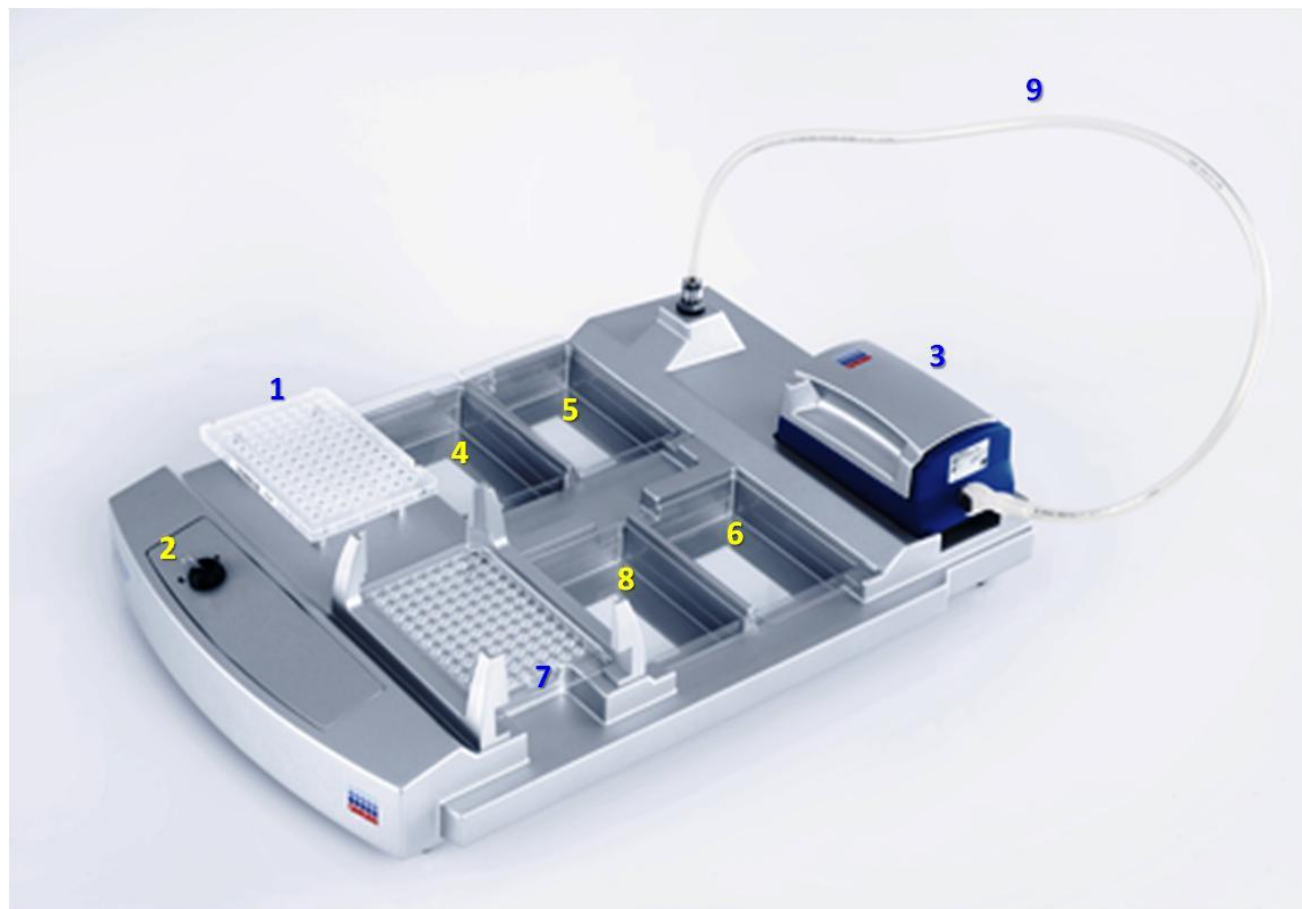
Nom du programme	Programme d'amplification primaire	Durée	Gène
PYRO-P1	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 45 °C x 45 sec >>> hybridation 4. 72 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 45 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	2 h 56 min	<i>pfdhfr</i>
PYRO-P2	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 45 °C x 30 sec >>> hybridation 4. 65 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 45 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	2 h 44 min	<i>pfdhps</i>
PFCRTPCR	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 45 °C x 45 sec >>> hybridation 4. 72 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 40 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	2 h 46 min	<i>pfprt</i>

Annexe 9 : Pyroséquenceur PSQ™ HS 96A et station de travail



Pyroséquenceur PSQ™ HS 96A avec chambre de pyroséquenceur ouverte et station de travail
(© QIAGEN, tous droits réservés).

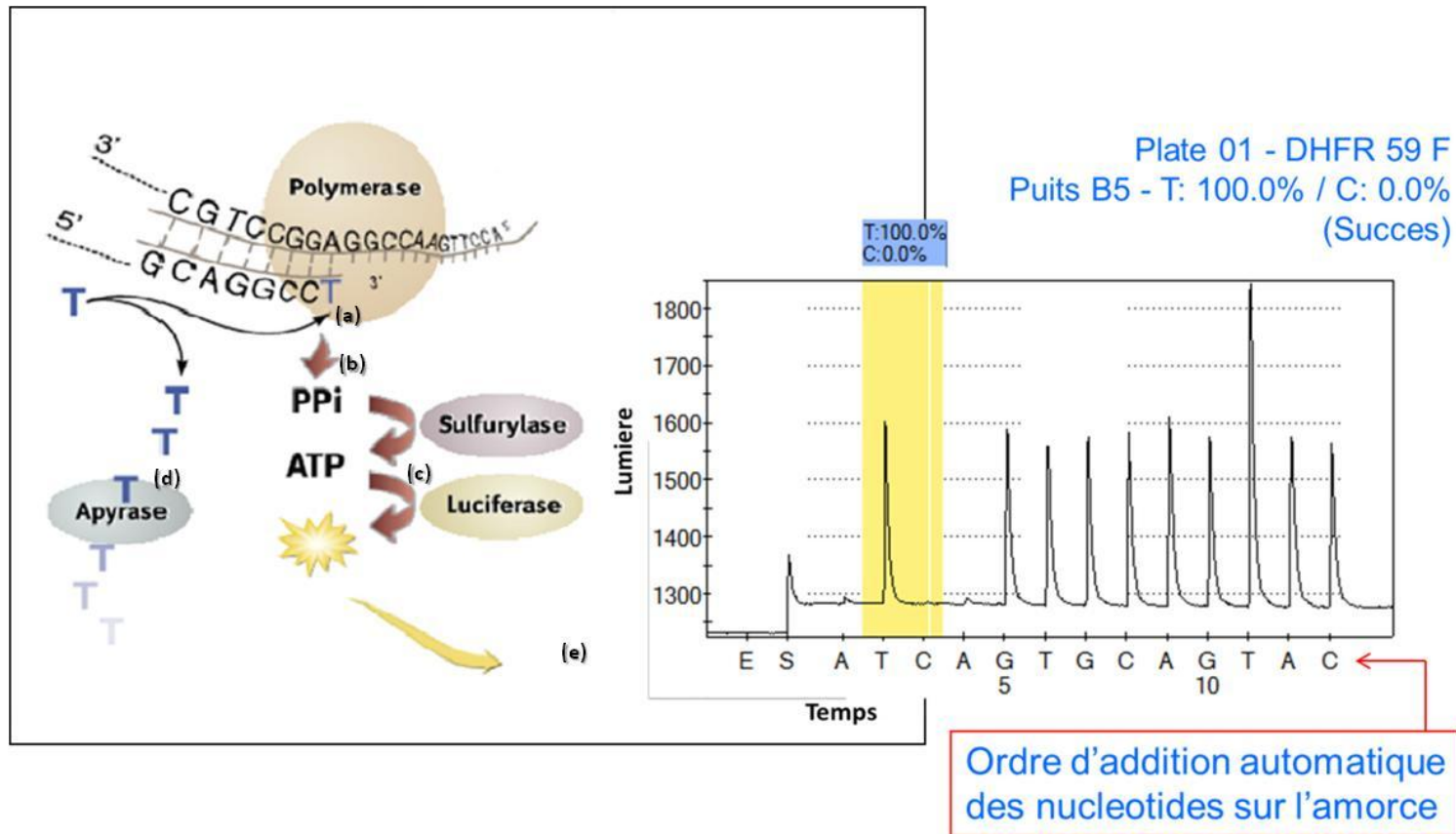
Annexe 10 : Station de travail du pyroséquenceur.



Station de travail *Pyrosequencing Vacuum Prep Tool* (© QIAGEN, tous droits réservés)

Note : Le milieu réactionnel de fixation de la microplaque de PCR2 (1) va être aspiré par emboîtement des dents à la face interne du filtre (3) après l'activation d'un aspirateur (2). Le filtre est ensuite placé successivement dans des auges (4 à 6) contenant de l'éthanol, un tampon de dénaturation à base de soude, puis du tampon de lavage, respectivement. Après désactivation (2) de l'aspirateur, les brins d'ADN monocaténaire du filtre alors obtenus sont transférés aux amorces de pyroséquençage par agitation manuelle du filtre emboîté à la microplaque (7) contenant la solution d'hybridation. A la fin de l'opération, le filtre est placé dans l'auge (8) contenant de l'eau MiliQ. Raccord du filtre à la station de travail (9).

Annexe 11 : Principe du pyroséquençage.



Note : (a) L'ADN polymérase catalyse l'incorporation du (dNTP) dans le brin d'ADN, si elle est complémentaire à la base dans le brin matrice (b). L'incorporation libère du PPi en une quantité équimolaire de la quantité de séquences de nucléotides incorporés (c) Conversion par la Sulfurylase ATP du PPi en présence d'adénosine 5-phosphosulfate (APS). Cet ATP entraîne la conversion luciférase-induite de la luciférine en oxyluciférine qui génère de la lumière visible dans des quantités proportionnelles à la quantité d'ATP (d). L'Apyrase, une enzyme dégradant les nucléotides, dégrade en continu les nucléotides non incorporés et l'ATP. Lorsque la dégradation est terminée, un autre nucléotide est ajouté (e). L'addition des dNTP se fait de façon séquentielle. Tout au long du processus, le brin complémentaire d'ADN est construit et la séquence de nucléotides est déterminée à partir des pics des signaux lumineux dans le Pyrogramme. Adapté (*biologie.univ-mrs.fr/2001odyssee_genome_v6_print.odp* consulté le 5 avril 2010).

Annexe 12 : Programme d'amplifications secondaires par nested-PCR des gènes *pfdhfr*, *pfdhps* et *pfprt*.

Codes	Programme d'amplifications	Durée	Gène et codon (s)
PYRO-S1	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 45 °C x 45 sec >>> hybridation 4. 65 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 25 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	1 h 47 min	<p><i>pfdhfr</i> 50, 51, 59</p> <p><i>pfdhps</i> 436, 437, 540, 581</p>
PYRO-S2	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 42 °C x 30 sec >>> hybridation 4. 65 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 25 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	1 h 43 min	<i>pfdhfr</i> 108
CRT100IN	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C x 5 min >>> dénaturation 2. 92 °C x 30 sec >>> dénaturation 3. 42 °C x 30 sec >>> hybridation 4. 65 °C x 45 sec >>> Extension. 5. 25 fois à partir de l'étape 2 6. 72 °C x 15 min >>> Extension 7. 4 °C>>> Infini 	1 h 30 min	<i>pfprt</i> 72, 74, 75, 76

Annexe 13 : Composition des milieux réactionnels pour les amplifications par PCR.

Type d'amplification	Composants	Concentration initiale	Volume (µL)	Concentration finale	Volume (µL) pour 100 échantillons
PCR multiplex	Eau pure		6,02		602
	Tampon	10 X	1	1 X	100
	MgCl ₂	50 Mm	0,6	3 mM	60
	dNTP	25 Mm	0,08	0,2 mM	8
	Amorces Poly-α	2,5 µM	0,4	0,1 µM	40
	Amorces TA-81	2,5 mM	0,4	0,1 µM	40
	Amorces PfPK2	2,5 mM	0,4	0,1 µM	40
	Taq poly	5 U/µL	0,1	0,5 U	10
	DNA		1		100
	Total			10	
Hémi-nested PCR	Eau pure		10,83		1083
	Tampon	10 X	2,5	1 X	150
	MgCl ₂	50 mM	0,75	2,5 mM	75
	dNTP	25 mM	0,12	0,2 mM	12
	Amorces dont une interne avec <i>Dye Primer</i>	10 µM	0,6	0,4 µM	60
	Taq poly	5 U/µL	0,2	2,0 U	20
	Produits PCR multiplexe		1		100
	Total			15	

Note: Une des amorces pour l'Hémi-nested PCR, notamment l'amorce interne porte un marqueur fluorescent (*Dye primer*). La Taq DNA Polymerase Recombinant a été livrée dans un tampon de conservation [20 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; Glycérol 50 % (v/v); stabilisateurs], le tampon 10 X sans MgCl₂ [200 mM de Tris-HCl(pH 8,4); KCl 500 mM] et le Chlorure de Magnésium ont été fournis par Invitrogen™.

Annexe 14 : Exemple de plan d'une microplaque de 96 puits de PCR 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DA34	DA42	DA50	DA58	DA66	DA74	DA82	DA90	DA98	DA106	DA115	DA123
B	DA35	DA43	DA51	DA59	DA67	DA75	DA83	DA91	DA99	DA107	DA116	DA124
C	DA36	DA44	DA52	DA60	DA68	DA76	DA84	DA92	DA100	DA108	DA117	DA125
D	DA37	DA45	DA53	DA61	DA69	DA77	DA85	DA93	DA101	DA109	DA118	DA126
E	DA38	DA46	DA54	DA62	DA70	DA78	DA86	DA94	DA102	DA111	506	3D7
F	DA39	DA47	DA55	DA63	DA71	DA79	DA87	DA95	DA103	DA112	DA120	HB3
G	DA40	DA48	DA56	DA64	DA72	DA80	DA88	DA96	DA104	DA113	DA121	PNC
H	DA41	DA49	DA57	DA65	DA73	DA81	DA89	DA97	DA105	DA114	DA122	SNC

Note : En bleu, les isolats de terrain. En vert, les contrôles positifs (3D7 et HB3) et négatifs (PNC et SNC). PNC : contrôle négatif de la première amplification. SNC : contrôle négatif de la seconde amplification. Pour la première amplification, de l'eau pure a été placée dans le puits H12 de la microplaque de PCR1. Le second contrôle négatif n'a été ajouté lors de la seconde amplification. Les chiffres de 1 à 12 représentent le repérage des colonnes et les lettres de A à H, celui des lignes. Ces repères servent à attribuer des coordonnées alphanumériques à chaque puits.

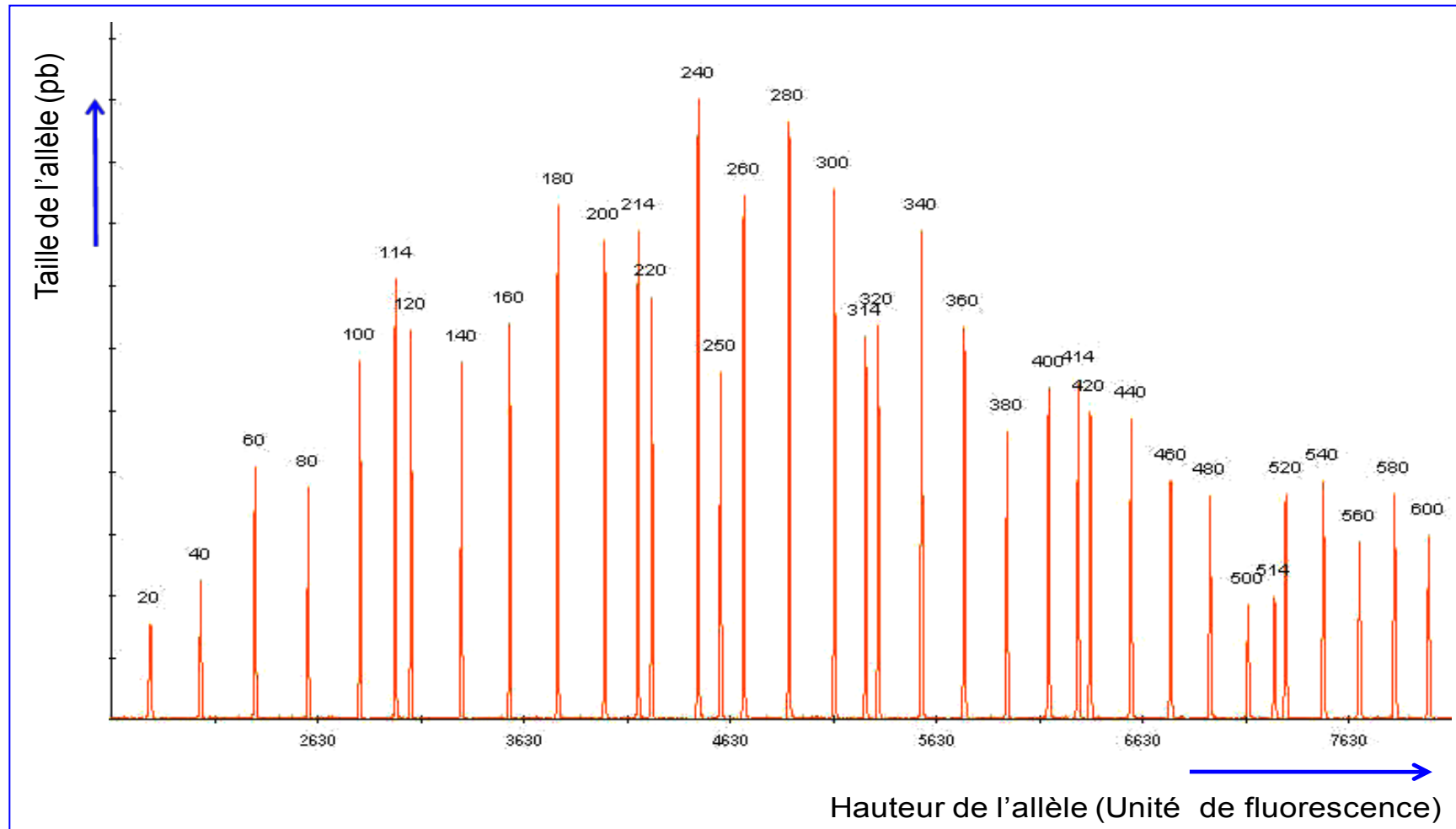
Annexe 15 : Programmes d'amplifications.

Type d'amplification	Codes	Programme d'amplifications	Durée	Microsatellites
PCR multiplex	HEMI-I	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C x 2 min >>> dénaturation 2. 94°C x 30 sec >>> dénaturation 3. 42 °C x 30 sec >>> hybridation 4. 40 °C x 30 sec >>> Extension. 5. 25 fois à partir de l'étape 2 6. 65 °C x 15 min >>> Extension 	2 h 15 min	<p>TA81 Poly-α PfPK2</p>
Hémi-nested PCR	HEMI-2	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C x 2 min >>> dénaturation 2. 94°C x 20 sec >>> dénaturation 3. 45 °C x 30 sec >>> hybridation 4. 65 °C x 30 sec >>> Extension. 5. 25 fois à partir de l'étape 2 6. 65 °C x 2 min >>> Extension 	1 h 15 min	<p>TA81 Poly-α PfPK2</p>

Annexe 16 : Milieu réactionnel pour une analyse des microplaques au Gene Scan

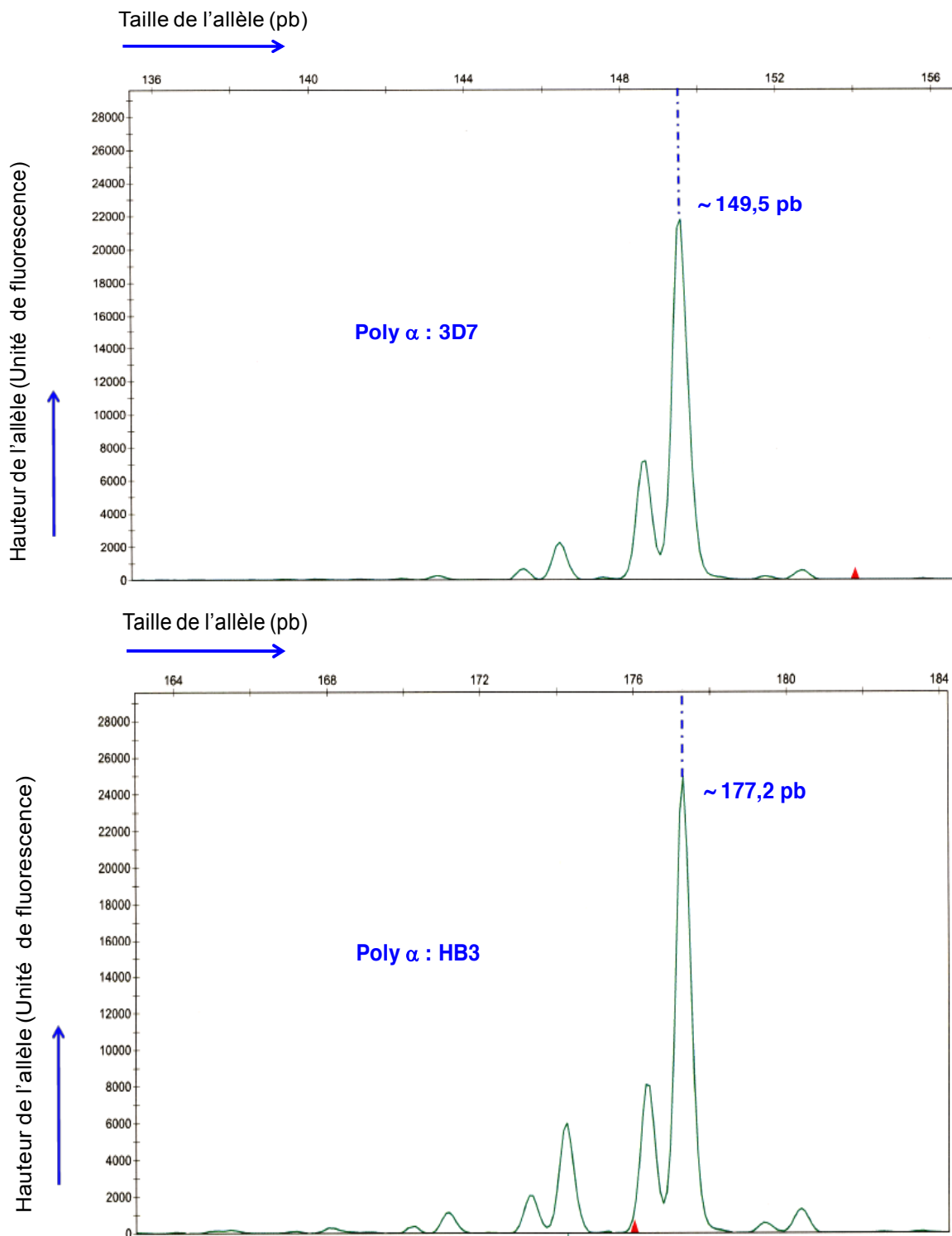
Composition	Volumes (µL)
Échelle de poids moléculaire Gène Scan™ - 600 LIZ®	0,75
Formamide Hi-Di™	8,25
Produit de l'Hémi-PCR nichée	1
Total	10

Annexe 17 : Échelle de poids moléculaire interne Gène Scan™ - 600 LIZ® utilisée dans l'analyse de la taille des allèles microsatellites

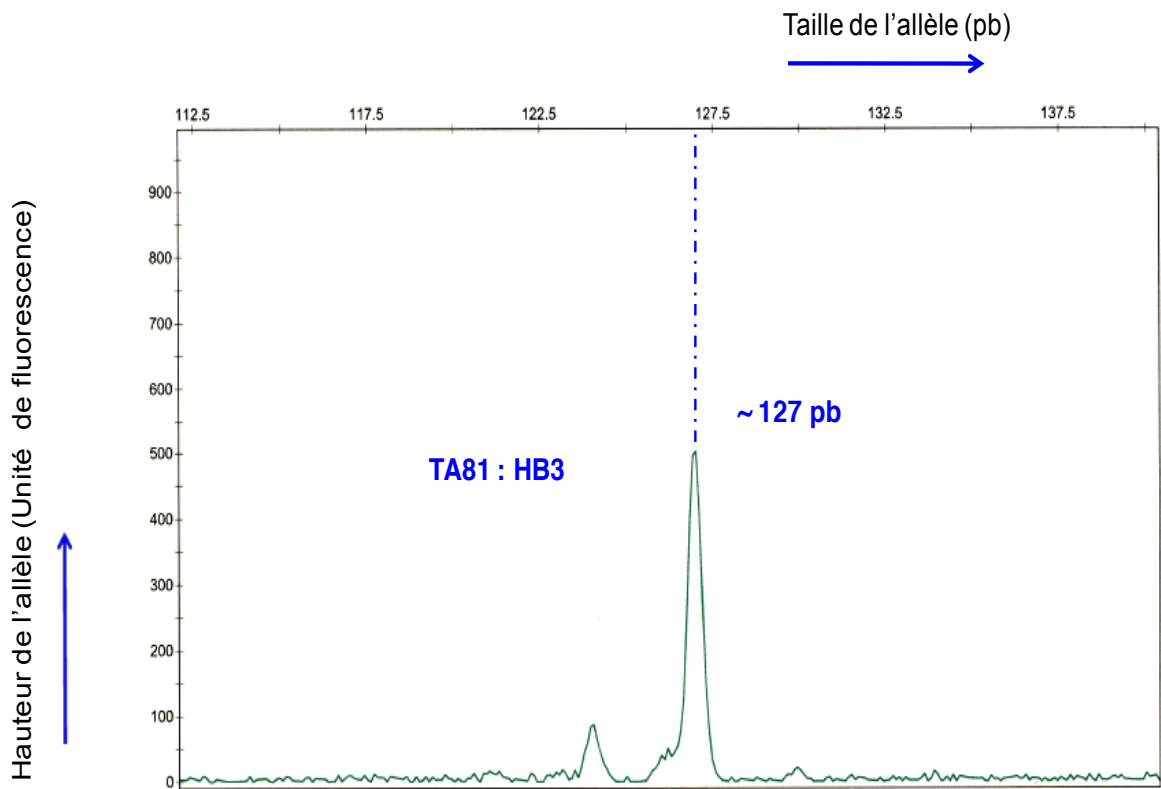
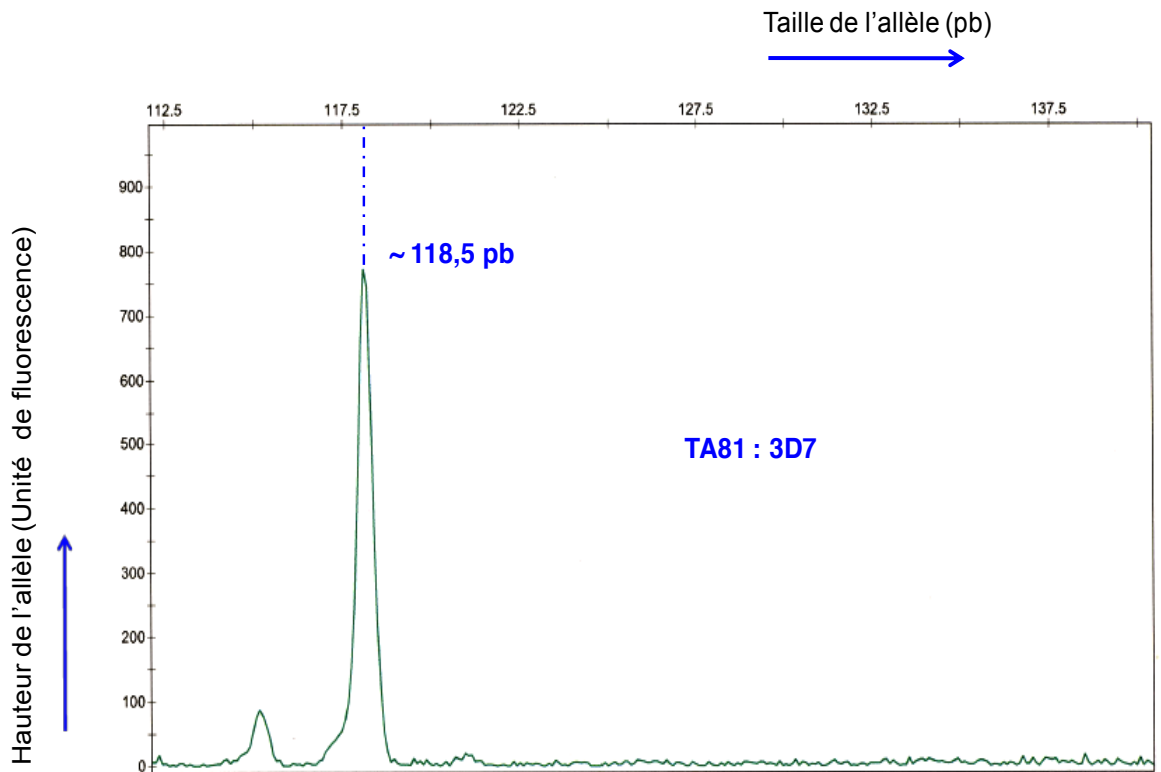


Adapté de *Applied Biosystems Gène Scan™ - 600 LIZ® Size Standard product insert*

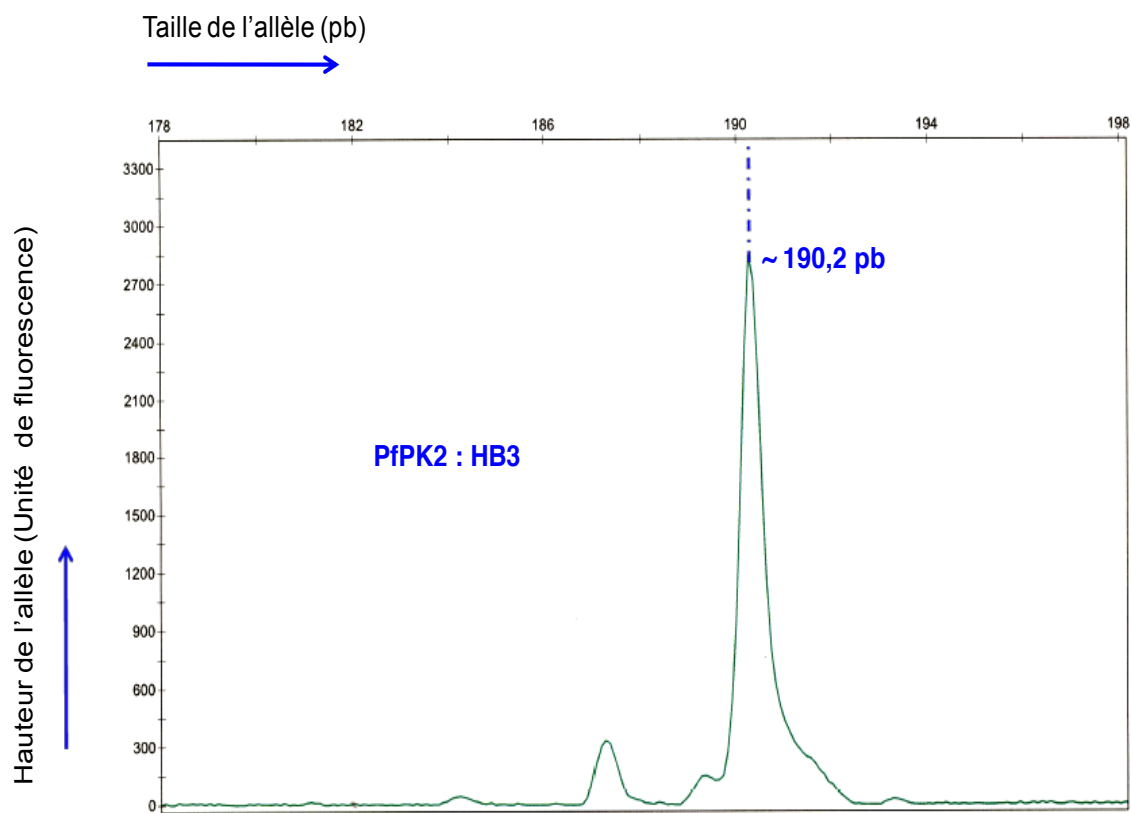
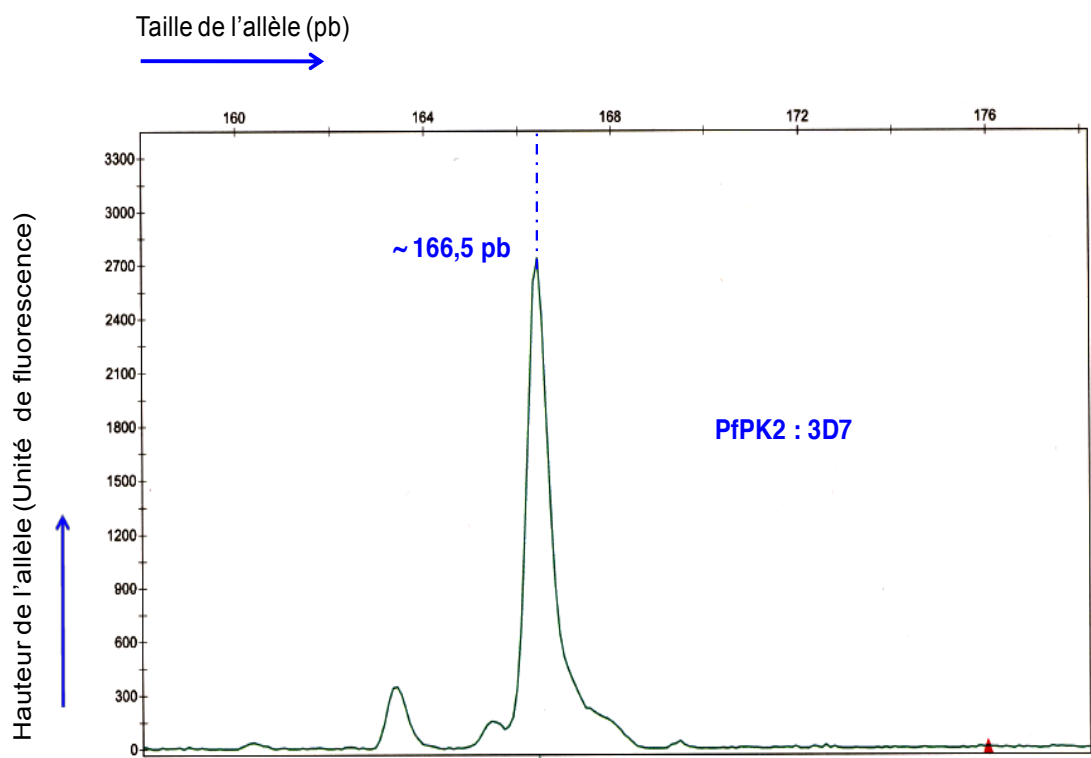
Annexe 18 : Formes des signaux et tailles des allèles microsatellite correspondant aux isolats de référence 3D7 et HB3.



Formes des signaux et tailles des allèles du locus microsatellite Poly- α correspondant aux isolats de référence 3D7 et HB3 (Photo : Ako Bérenger).



Formes des signaux et tailles des allèles du locus microsatellite TA81 correspondant aux isolats de référence 3D7 et HB3 (Photo : Ako Bérenger).



Formes des signaux et tailles des allèles du locus microsatellite P_fPK2 correspondant aux isolats référence 3D7 et HB3 (Photo : Ako Bérenger)

DEUX (2) ARTICLES PUBLIES

1. **Berenger Aristide Ako**, André Toure Offianan, Marnie Johansson, Louis Koné Penali, Simon-Pierre Assanvo Nguetta, Carol Hopkin Sibley. (2005). Molecular analysis of markers associated with chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine résistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites from southeastern Côte-d'Ivoire by the time of Artemisinin-based Combination Therapy adoption in 2005. *Infection and Drug Résistance*5, 113-120
2. Gharbi M, Flegg JA, Pradines B, **Berenger A**, Ndiaye M, Djimdé AA, Roper C, Hubert V, Kendjo E, Venkatesan M, Brasseur P, Gaye O, Offianan AT, Penali P, Le Bras J, Guérin PJ, Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study (2013). Surveillance of Travellers: An Additional Tool for Tracking Antimalarial Drug Résistance in Endemic Countries. *PLoS ONE*8(10), e77775.

Molecular analysis of markers associated with chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites from southeastern Côte-d'Ivoire by the time of Artemisinin-based Combination Therapy adoption in 2005

Berenger Aristide Ako¹
André Toure Offianan¹
Marnie Johansson²
Louis Koné Penali¹
Simon-Pierre Assanvo
Nguetta³
Carol Hopkin Sibley²

¹Department of Malariology, Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire; ²Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA, USA; ³Laboratoire de Génétique, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire

Correspondence: Berenger Aristide Ako
Department of Malariology, Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, PO Box 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire
Tel +225 02 580 338
Fax +225 22 485 363
Email ako.aab@gmail.com

Purpose: Artemisin-based combination therapies became the recommended therapy in Côte-d'Ivoire in 2005, but both chloroquine (CQ) and sulfadoxine/pyrimethamine (SP) have been heavily used for many decades. Despite this long history, little is known about the geographical distribution of drug resistance-conferring genotypes outside the capital city of Abidjan. In this work, we compared the prevalence of drug-resistant genotypes in Bonoua, an urban area, and Samo, a rural agricultural area, in southeastern Côte-d'Ivoire, about 59 km from Abidjan.

Patients and methods: Samples were collected from symptomatic patients in both sites during the rainy season in 2005. Genomic DNA was isolated and codons associated with resistance to CQ and SP were analyzed: *pfprt* codons Cys-72-Ser, Val-73-Val, Met-74-Ile, Arg-75-Glu, Lys-76-Thr; *pfdhfr* codons Ala-16-Val, Arg-51-Ile, Cys-59-Arg, Ser-108-Arg/Thr, and Ile-164-Leu; *pfdhps* codons Ser-436-Ala, Ala-437-Gly, Lys-540-Glu, Ala-581-Gly, and Ala-613-Thr/Ser.

Results: A limited number of genotypes were found in Bonoua compared with Samo. In both sites, the triple-mutant allele **CVIET** of *pfprt* predominated: 100% in Bonoua and 86.2% in Samo. The wild-type allele, NCSI of *pfdhfr*, was common – 50% in Bonoua and 38.7% in Samo – but the triple-mutant **IRNI** and double-mutant NRNI were also frequent (**IRNI**, 32.6% in Bonoua and 19.4% in Samo; **NRNI**, 15.2% in Bonoua and 9.7% in Samo). In Samo, a wide range of different genotypes of *Pfdhps* was observed, with alleles carrying the Gly-437 codon fixed in Bonoua and comprising 73% of the isolates in Samo.

Conclusion: Although these two sites are only 8 km apart, they belonged to very different ecological environments. The overall prevalence of alleles of single-nucleotide polymorphisms associated with resistance to CQ and SP in both locations was among the highest of the region by 2005, although the more rural site showed a more diverse set of alleles and mixed infections. Continued surveillance of these markers will be a useful tool for drug policy, as both CQ and SP are still frequently used years after withdrawal, and SP is recommended by the World Health Organization for intermittent preventive therapy for pregnant women and infants. Data analyzed herein are among the first to be generated during the year of artemisin-based combination-therapy introduction in Côte-d'Ivoire and could be of some interest for malaria policy-makers.

Keywords: Côte-d'Ivoire, malaria resistance, chloroquine, sulfadoxine/pyrimethamine, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfprt*

Introduction

Côte-d'Ivoire was among the African countries to recommend chloroquine (CQ) as the main antimalarial treatment more than 40 years ago.¹ However, resistance to CQ was detected from returning travelers as early as 1986² and confirmed locally in 1987.³ Since then, there has been an upward trend in the prevalence and degree of CQ resistance.^{1,4,5} In 2003, CQ was replaced by amodiaquine (AQ) as the first-line therapy.

Few sulfadoxine/pyrimethamine (SP) trials were implemented in the country before 2003. SP was officially maintained as second-line treatment for uncomplicated *falciparum* malaria until 2005, when both AQ and SP were withdrawn in favor of artemisin-based combination therapies (ACTs), as recommended by the World Health Organization: artesunate/amodiaquine as first-line treatment and artemether/lumefantrine as second-line.⁶ However, as is often the case,^{7,8} there is still extensive access to SP, CQ, and AQ, and their much lower cost has encouraged continued use of these monotherapies.⁹ In addition, preference of patients for SP over AQ also meant that SP use was frequent; CQ withdrawal from the market was effectively realized 4 years after the official decision, upon a ministerial decree published in 2007.

Resistance to pyrimethamine has been correlated with parasites that carry mutations at codons 51, 59, 108, and 164 in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (*pf dhfr*) gene, and resistance to sulfadoxine with mutations at codons 436, 437, 540, 581, and 613 in the *P. falciparum* dihydropteroate synthase (*pf dhps*) gene.¹⁰ Similarly, alleles of *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*pf crt*) gene with mutant codons at positions 72–76 have been closely associated with resistance to CQ and AQ.¹⁰

In light of the heavy use of SP and CQ, it is not surprising that a high prevalence of mutant genotypes of *pf dhfr*, *pf dhps*, and *pf crt* were reported in Abidjan, where drug resistance has been studied for years.^{10,11} However, there is still almost no information on the frequency of markers of drug resistance in settings other than Abidjan. Moreover, there are few data examining the dynamics of genes conferring drug resistance between urban and rural settings in the country. The purpose of this work was to compare the genetic diversity of antimalarial drug resistance-conferring genotypes between neighboring urban and rural sites 59 km removed from Abidjan, by the year of ACTs introduction. Data analyzed herein are among the first generated during the year of implementation of ACT in Côte-d'Ivoire and provide information for policy decisions on drug policy and use in the country.

Material and methods

Study sites, participants, and sample collection

Samples were collected from symptomatic children (6–59 months of age) in Bonoua and Samo from June to December, 2005.¹² Bonoua (5°16'16.24 N; 3°35'38.13 W) is an urban site 59 km from Abidjan, and Samo, a rural area, is 8 km from Bonoua. Both sites belong to the sanitary district of Grand-Bassam (region of Sud-Comoe). Samples were collected on the day of inclusion from patients admitted with acute uncomplicated *P. falciparum* infection either at the local General Hospital in Bonoua or at the Health Care Center in Samo. Thick and thin blood smears were prepared for microscopic identification of *P. falciparum*. Mono-infection with *P. falciparum* was detected from Giemsa-stained blood smears, as described elsewhere.¹²

The study protocol received approval from the National Ethics and Research Committee prior to the implementation and was conducted in compliance with International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice guidelines according to the Declaration of Helsinki (2000, amended in Tokyo 2004). The parents or guardians of the children provided participants' informed consent prior to inclusion.

Extraction of *Plasmodium falciparum* DNA

Whole blood from *P. falciparum*-positive persons was blotted on sterile Whatman (Maidstone, United Kingdom) 3 MM filter paper, stored dry at room temperature, protected with a silica-gel desiccant, and archived for later *P. falciparum* DNA isolation. DNA was extracted from blood spotted on filter paper using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA), as per manufacturer's protocol. Genomic DNA (gDNA) was isolated from samples diagnosed as *P. falciparum*-positive persons.

PCR amplifications

Primers used for amplifications are described in Table 1. Extracted gDNA was amplified in two rounds of nested polymerase chain reaction (PCR). The first-round PCR amplifications were performed in a final volume of 20 μ L, comprising 7 μ L of pure water, 10 μ L of 1 \times PCR PreMix A (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI), 0.4 μ L of each primer 10 mM, 0.2 μ L of FailSafe enzyme (Epicentre Biotechnologies), and 2 μ L of template DNA. The second-round PCR amplification reactions were performed similarly to the first, with 0.5 μ L of PCR products as DNA template and 8.5 μ L of pure water. All reactions were performed

Table 1 Primers used for polymerase chain reaction amplifications and amplification for sequencing

Genes	Round	Primers	Sequences (5'-3')	Size (bp)
PCR amplifications				
<i>pfcr</i>	Primary	S1236 (forward)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	21
		S1237 (reverse)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	24
<i>pfdhfr</i>	Primary	S217 (forward)	CTC CTT TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT TTC G	37
		S218 (reverse)	TCA TAT GAC ATG TAT CTT TGT CAT CAT TCT TTA AAG GC	38
	Secondary	S1226 (forward)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
		S1227 (reverse)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pfdhps</i>	Primary	S219 (forward)	GTC TGC GAC GTT TTC GAT ATT TAT GCC	27
		S229 (reverse)	GGC ATA TCA TTA TTT TTT TCT TCT CCT TTT TAT AC	34
	Secondary	S1224 (forward)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
		S1225 (reverse)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21
Amplifications for sequencing				
<i>pfcr</i>		S1236 (forward)	GGT GGA GGT TCT TGT CTT GG	21
		S1237 (reverse)	ATT AAA GTT GTG AGT TTC GGA TG	24
<i>pfdhfr</i>		S1226 (forward)	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	20
		S1227 (reverse)	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	21
<i>pfdhps</i>		S1224 (forward)	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	20
		S1225 (reverse)	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	21

Notes: A premix for amplification of sequencing comprised only the one relevant primer used for the nested polymerase chain reaction (PCR) amplification. Products were incubated at 15°C for 5 minutes.

using 96-well plates on an MJ Research Tetrad PTC-225 Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA).

Cycling conditions for the first- and second-round PCR cycles for *pfdhfr* were as follows: 94°C for 3 minutes; 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 50°C for 45 seconds, and 72°C for 60 seconds; and a final extension at 72°C for 10 minutes. For *pfdhps*, the amplification conditions were 94°C for 3 minutes; 34 cycles of 94°C for 45 seconds, 51°C for 45 seconds, and 60°C for 45 seconds; and a final extension at 60°C for 5 minutes. And for *pfcr*, the amplification conditions were 94°C for 3 minutes; 34 cycles of 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, and 62°C for 60 seconds; and a final extension at 62°C for 5 minutes.

Amplifications for sequencing reactions

The cycling sequencing reactions consisted of a linear amplification of extension products with BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA). Two master mixes were prepared for amplification, with one primer per mixture. Each master mix contained a total volume of 10 µL, using 2 µL of nested PCR product, 1.7 µL of 5 × sequencing buffer for BigDye (400 mmol/L of Tris-HCl and 10 mmol/L of MgCl₂; pH 9.0), 0.8 µmol/L of primer, and 1 µL of BigDye Terminator.

Sequence analysis

Sequencing was run in both directions; products of amplification for sequencing were separated and analyzed on an ABI 3100 (Applied Biosystems). The DNA sequence assembly software Sequencher 4.1.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI),

was used for base calling, trimming, display, and editing of sequences automatically read on the capillary machine. Control sequences of *pfdhfr* and *pfdhps* genes from *P. falciparum* 3D7 strain were uploaded from GenBank for SNPs detection. The following codon positions were screened to detect point mutations associated with SP resistance: *pfdhfr* N51I, C59R, S108N/T, I164L, *pfdhps* S436A, A437G, K540E, A581G, A613T/S, and exon 2 of *pfcr* C72S, V73V, M74I, N75E, K76T. Analysis was repeated twice, mainly for uncommon data. More than one chromatogram peak at the same codon locus was indicative of a mixed infection only if the height of the additional peak was more than 33% the height of the major peak. Mixed mutant (Mu) genotypes are detected when two or more populations of parasites with distinct genotypes at particular codons of interest are present in a single infection.¹³

Statistical analysis

The statistical analyses were performed with XLSTAT software, version 2010.6 (Addinsoft, Paris, France). Proportions were compared with a one-sided Z-test of comparison for two proportions. A 95% confidence interval around the difference of proportions was determined. A *P*-value lower than 0.05 was taken to indicate statistically significant differences. Frequencies of mutant (Mu), mixed (Mi), and wild-type (WT) genotypes were determined separately by the following relations as suggested by Sridaran et al.¹⁴ Mutants = Mu/(Mu + Mi + WT); mixed alleles = Mi/(Mu + Mi + WT); wild type = WT/(Mu + Mi + WT).

Results

Success rates of molecular analysis conducted with samples collected from Bonoua and Samo are shown in Table 2.

Frequencies of genotypes associated with chloroquine resistance

Table 3 displays differences between Bonoua and Samo in the diversity and prevalence of CQ resistance–conferring genotypes, and Table 4 details these at the level of SNPs. The mutant genotype *pfprt* Ile-74/Glu-75/Thr-76 (CVIET) reached fixation in Bonoua; neither mixed infections nor any other genotypes were detected there. In contrast, 8 km apart, in Samo, fixation of CVIET was not fully reached (38/44 [86.2%]). The triple-mutant haplotype was predominant, but six other genotypes were also detected, among which were the less common haplotype, *pfprt* Met-74/Glu-75/Thr-76 (CVMET) and four mixed genotypes. The frequency of the triple-mutant CVIET was significantly higher in Bonoua ($P = 0.004$).

Frequencies of individual mutant codons are compared in Table 4. The individual amino acids Cys-72, Ile-74, and Glu-75 comprising the triple-mutant haplotype CVIET were found in all the 48 isolates from Bonoua. In Samo, 38/47 (81%) of the isolates carried the mutation that encodes Ile-74, and 40/47 (85%) carried the mutant Glu-75. Most important, the prevalence of the key amino acid Thr-76 was higher than 90% in both sites (Table 4). No mutations were found in codon Val-73 in either site.

Frequencies of pyrimethamine resistance–conferring genotypes

There were no significant differences in frequencies for *pfdhfr* pure and mutant genotypes in Bonoua and Samo. The diversity of these genotypes was much lower in Bonoua than in Samo, where more mixed genotypes were detected. Three pure genotypes were detected in both sites (Table 4). The wild-type allele Asn-51/Cys-59/Ser-108 (NCSI) predominated in both sites (23/46, 50% in Bonoua,

and 12/31, 38.7% from Samo); the triple-mutant Ile-51/Arg-59/Asn-108 (IRNI) was also common, (15/46, 32.6% in Bonoua, and 6/31, 19.4% in Samo). The double-mutant Asn-51/Arg-59/Asn-108 (NRNI) was observed in 7/46 (15.2%) of isolates in Bonoua and 3/31 (9.7%) in Samo. Five mixed genotypes, most of them with rare frequencies, were found in Samo but only one mixed genotype in Bonoua N-C/R-SI. The frequency of the mutant codon Asn-108 was almost 50% for both sites. All of the isolates also carried the wild-type Ile-164. Difference in the frequencies of individual mutation alleles and genotypes between Bonoua and Samo were not significant (Table 4).

Distribution and frequencies of sulfadoxine resistance–conferring genotypes

For both the *pfprt* and *pfdhfr* loci, the number of mixed genotypes was lower than the number of pure genotypes for each of the analyzed genes (Table 3). In contrast for *pfdhps*, the frequency of isolates that carried mixed genotypes was higher in Bonoua, whereas in Samo, purely mutant genotypes predominated significantly ($P = 0.001$, not shown here). Again, the diversity of genotypes for the *pfdhps* gene was much lower in Bonoua than in Samo (Table 3). The single-mutant S $\overline{\text{G}}$ KAA was the unique pure genotype found in isolates from Bonoua. It was carried by four isolates (9.8%) among the 41 obtained in Bonoua and was the only allele that both sites had in common. In Samo, six additional pure genotypes were detected, among which were the uncommon double mutants FAKAS and YAKAS, and the triple mutants $\overline{\text{A}}$ GKAA. Each of these genotypes, as well as the wild-type SAKAA were found in only one (3.3%) among 30 isolates from Samo. The double-mutant $\overline{\text{A}}$ GKAA and the single-mutant $\overline{\text{A}}$ AKAA were also detected in eight (26.8%) and three (10%) isolates out of the 30, respectively (Table 3).

Two mixed genotypes (S/ $\overline{\text{A}}$ -GKAA and S/ $\overline{\text{L}}$ -GKAA) among five were found in Bonoua. Particular attention has been paid to the unusual S/ $\overline{\text{L}}$ -GKAA genotype.

Table 2 Success rates of molecular analysis of samples collected from Bonoua and Samo by the time of artemisin-based combination-therapy introduction

Sites	Filter-paper samples collected	Samples DNA-extracted	Samples successfully amplified (%)	Samples successfully sequenced (%)		
				<i>pfprt</i>	<i>pfdhfr</i>	<i>pfdhps</i>
Bonoua	69	66	48 (72.7)	48 (72.7)	46 (69.7)	41 (62.1)
Samo	63	52	49 (94.2)	44 (84.6)	31 (59.6)	30 (57.7)
Total	132	118	97 (82.2)	92 (78.0)	77 (65.3)	71 (60.2)

Notes: Both success rate of polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing reaction were calculated based on the number of DNA-extracted samples per site. For each site, the number of successfully amplified isolates was $n = 48$ out of 69 in Bonoua and $n = 49$ out of 63 in Samo. Failure to amplify fragments from a fraction of the patient samples was due to quality of the filter paper used, and extraction efficiency from the paper. All PCR amplification failures were excluded from further analysis.

Table 3 Distribution of genotypes conferring resistance to chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine in Bonoua and Samo in 2005 by the time of artemisin-based combination-therapy adoption

Genes	Genotypes	Bonoua		Samo		Significant P-value
		n	(%)	n	(%)	
<i>pfcr</i>	Haplotypes					
	CVIET	48	(100.0)	38	(86.2)	0.004
	CVMET	0	(0.0)	1	(2.3)	
	CVMNK	0	(0.0)	1	(2.3)	
	Mixed					
	CV-M/I-N/E-T	0	(0.0)	1	(2.3)	
	CV-M/I-N/E-K/T	0	(0.0)	1	(2.3)	
	CVME-K/T	0	(0.0)	1	(2.3)	
	CV-M/N-E-K/T	0	(0.0)	1	(2.3)	
	Total	48	(100.0)	44	(100.0)	
<i>pfdhfr</i>	Haplotypes					
	NCSI	23	(50.0)	12	(38.7)	
	IRNI	15	(32.6)	6	(19.4)	
	NRNI	7	(15.2)	3	(9.7)	
	Mixed					
	N/I-C/R-S/N-I	0	(0.0)	6	(19.4)	
	N/I-C/R-SI	0	(0.0)	1	(3.2)	
	N/I-CSI	0	(0.0)	1	(3.2)	
	N/I-RNI	0	(0.0)	1	(3.2)	
	N-C/R-S/N-I	0	(0.0)	1	(3.2)	
	N-C/R-SI	1	(2.2)	0	(0.0)	
	Total	46	(100.0)	31	(100.0)	
	<i>pfdhps</i>	Haplotypes				
AGKAA		0	(0.0)	8	(26.8)	<0.0001
SGKAA		4	(9.8)	7	(23.3)	
AAKAA		0	(0.0)	3	(10.0)	
AGKAS		0	(0.0)	1	(3.3)	
FAKAS		0	(0.0)	1	(3.3)	
SAKAA		0	(0.0)	1	(3.3)	
YAKAS		0	(0.0)	1	(3.3)	
Mixed						
S/A-GKAA		13	(31.7)	4	(13.4)	0.027
S/A-GKA-A/S		0	(0.0)	2	(6.7)	
A-G/A-KAA		0	(0.0)	1	(3.3)	
S/A-G/A-KAA		0	(0.0)	1	(3.3)	
S/L-GKAA		24	(58.5)	0	(0.0)	
Total	41	(100.0)	30	(100.0)		

Notes: Capital letters in the genotypes column represent the single-letter codes of amino acids. Mutant amino acids are in bold and underlined. The total represents the number of successfully sequenced samples from each site.

Sequencing was repeated twice, and results were validated by an experienced technician. As a mixed genotype, its frequency was unexpectedly high in that setting: it was carried by 24 isolates (58.5%) out of 41 (Table 3).

The codon Ser-436-Ala appeared to be trimorphic with two mutant alleles, Phe-436 and Tyr-436, and the wild-type allele Ser-436 identified in Samo. The frequency of the mutant allele Gly-437 was significantly higher in Bonoua ($P = 0.0005$), where it was a component of the three

genotypes found there (Table 4). No change was identified in the locus Lys-540 or Ala-581, positions in which mutants have been observed in the East African region.¹⁰ Five alleles carried the Ser-613 mutation (Table 4).

Discussion

The purpose of the study was to compare the genetic diversity of molecular markers conferring CQ and SP resistance in isolates from symptomatic patients from two different settings: urban Bonoua and rural Samo, in southeastern Côte-d'Ivoire. In both sites, the **CVIET** allele of *pfcr* was predominant, and in fact was fixed in Bonoua. Resistant alleles of *pfdhfr* and *pfdhps* were at a much lower level, although the triple-mutant allele **IRNI** associated with high-level resistance to pyrimethamine was common, but not predominant, in both locations.

A wide range of *pfdhps* genotypes was observed in both locations, but alleles carrying the single-mutant codon Gly-437 predominated. Differences in the diversity of alleles in the two settings was striking as well. In the rural Samo site, mixed infections were far more common than in Bonoua, and a number of unusual alleles of *pfdhps* were observed. For example, the simple mutant **SGKAA** was the only pure mutant among three *pfdhps* genotypes determined from Bonoua, while in Samo up to 11 genotypes were found. Our data suggest differences in the dynamics of distribution of drug resistance-conferring genotypes.

A complex interaction among several factors could explain the broader range of genetic variability in Samo in 2005: urbanization and rural exodus, agricultural activities and anopheline density, and migration in human populations. Differences in the distribution of resistant genotypes may reflect the different levels of urbanization of Bonoua and Samo. Our results confirm those of Soulama et al,¹³ who found it significant that in Burkina Faso, urbanization affects the distribution of genotypes and allelic polymorphism of *MSP1* and *MSP2* between rural and urban areas. In the same country, differences in the prevalence of drug-resistance markers may be explained by a higher drug pressure in the urban area compared to the rural study area.¹⁵

An average *P. falciparum* entomological infection rate of 314.7 infective bites/person-year was recently reported for the whole country,¹⁶ but not yet for Bonoua nor Samo. However a higher mixed-infection rate in Samo suggests higher malaria transmission in this agricultural area.¹⁷ Many crops, like maize, vegetables, irrigated rice, and pineapple, a major crop in Samo, present excellent breeding foci for mosquitoes, lending support to this idea.¹⁸⁻²⁰

Table 4 Spread of individual codon alleles between Bonoua and Samo in 2005 by the time of artemisin-based combination therapy adoption

Genes	Locus	Alleles	Bonoua		Samo		Significant P-value	
			Proportions	(%)	Proportions	(%)		
<i>pfcr</i>	M74I	I	48/48	(100.0)	38/47	(81.0)	<0.0001	
		M/I	00/48	(0.0)	02/47	(4.0)		
	N75E	E	48/48	(100.0)	40/47	(85.0)	0.002	
		N/E	00/48	(0.0)	01/47	(2.0)		
K76T	T	48/48	(100.0)	40/42	(95.0)			
	K/T	00/48	(0.0)	01/42	(2.0)			
<i>pfdhfr</i>	N51I	I	15/46	(33.0)	06/31	(19.0)	0.002	
		N/I	31/46	(67.0)	16/31	(52.0)		
	C59R	R	23/46	(50.0)	13/31	(42.0)		
		C/R	01/46	(2.0)	08/31	(26.0)		
	S108N/T	N	24/46	(52.0)	14/31	(45.0)		
	S/N	00/46	(0.0)	07/31	(23.0)	0.001		
<i>pfdhps</i>	S436A	F	00/41	(0.0)	01/30	(3.0)	<0.0001	
		Y	00/41	(0.0)	01/30	(3.0)		
		S/A	13/41	(32.0)	07/30	(23.0)		
		S/L	24/41	(59.0)	00/30	(0.0)		
	A437G	G	41/41	(100.0)	22/30	(73.0)		<0.0001
		A/G	00/41	(0.0)	01/30	(3.0)		
	A581G	A	42/42	(100.0)	30/30	(100.0)		
	A613S	S	00/42	(0.0)	03/30	(10.0)		0.034
		A/S	00/42	(0.0)	02/30	(7.0)		

Notes: Capital letters in the alleles column represent the single-letter codes for amino acids. Mutant amino acids are in bold and underlined. The denominator of each fraction represents the total number of gene fragments analyzed successfully for that locus. Only significant *P*-values < 0.05 have been reported. Some missing data were found that varied according to the locus or combination of loci analyzed. As a result, the number of successfully sequenced fragments also varied according to the locus or combination of loci analyzed.

Bogreau et al asserted that genetic diversity is more intense in urban areas due to an influx of people from surrounding rural areas bringing parasites to new locations.²¹ In fact, in our study, it is likely that the rural Samo area experienced an influx of people from neighboring countries and within Côte-d'Ivoire, attracted by a major increase in pineapple cultivation. Migrants were attracted to the southern region of Côte-d'Ivoire in search of employment. The largest pineapple farms from southern country and industrial activities were settled nearby Samo.^{19–22}

Pearce et al emphasized that haplotypes **AGK** and **SGK**, such as those reported here in Samo, are commonly encountered in West Africa.²³ For example, these were found in returning travelers from Nigeria, Ghana, Mali, and Guinea but also from Côte-d'Ivoire, as shown by Sutherland and colleagues.²⁴ These observations support the idea that the heterogeneity of the human population in Samo could be an important element in the greater parasite diversity as well. Thus, a determinant is not necessarily whether a site is urban or rural, but rather the heterogeneity of the parasites brought by people as they migrate from other areas into the site being studied.²

The very high level of the triple-mutant genotype *pfcr* **CVIET** in both sites and its 100% frequency in Bonoua are

consistent with other sites in West Africa and consistent with other measures of CQ resistance in Côte-d'Ivoire. Measures of clinical resistance were observed as early as 1986,² and increased progressively from 2%–28.9% between 1986 and 1988¹ to 43% in the western part of the country in 2001.²⁵ In vitro tests on isolates in Abidjan, in 2000 and later in 2004, confirmed the reduced sensitivity of parasites in this region to CQ, as well. The average IC₅₀ value (the concentration of CQ required to inhibit growth by 50%) for CQ-resistant isolates was 196 nM compared to less than 100 nM for sensitive parasites in 2000, and 225 nM compared to 47 nM in 2004.^{26,27} All of these data underscore the intense CQ drug pressure in this region, resulting in the virtual fixation of the triple-mutant genotype **CVIET** observed in 2005 in Bonoua.

By the time of ACTs adoption, CQ and SP were still available from unofficial retailers,⁹ thus allowing self-medication,⁸ or from pharmacies, since a ministerial decree to implement effective CQ withdrawal from the local drug market only came late in 2007. This context was certainly exacerbated by the political unrest in the country at that time, a situation that compromised the ability of the malaria-control program to monitor compliance with the new malaria-treatment recommendations.²⁸ In any case, our findings could seriously

compromise the use, if any, of new antimalarial therapeutic combinations with CQ for intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) or further IPT for infants in either of these sites.^{29,30}

Prevalence of the mutation Gly-437 was significantly higher in Bonoua, where it reached 100%, detected in 41/41 isolates, but 22/30 (73%) of samples in Samo, and this codon was associated with polymorphism in Ala-436.¹⁰ Consistent with this observation, the mutant allele Gly-437 was also a component of all the three mutant haplotypes detected in the area. In fact, it is unusual to observe a high prevalence of mutant alleles of *pf dhps* in parasite populations where the prevalence of the triple-mutant *pf dhfr* allele **IRNI** is low, as it is here. This suggests that the usage of sulfa drugs in Bonoua and Samo may have exerted strong drug pressure on *falciparum* populations from Bonoua and Samo.³¹ Thus the monitoring of sulfadoxine and related drugs is required, especially since trimethoprim–sulfamethoxazole is in use as prophylaxis for people living with HIV.^{32,33}

There was no significant difference in the prevalence of Asn-108 or Arg-59 between the two sites. The prevalence of the mutant allele Asn-108 is of the same order of magnitude, with 45.5% and 46.4% of prevalence determined for the same allele in 2001 and 2006, respectively, in Abidjan.^{26,34,35} In contrast, the higher rate of NCSI in both sites (50% in Bonoua and 38.7% in Samo) compared to **IRNI** (32.6% in Bonoua and 19.4% in Samo), suggests that pyrimethamine was likely still clinically effective by the time of SP withdrawal, but this may certainly have changed in the subsequent 7 years. Fortunately, in a recent paper,³⁶ Ouattara reported a lower prevalence of 35% of **IRNI** in Adzopé in 2007, located inland 108 km from Abidjan. Spatiotemporal studies would confirm whether the prevalence of this key mutation, along with SP pressure, decreases as one samples further inland. The prevalence of molecular markers associated with CQ and SP resistance could greatly increase in and around foci like big cities and decrease when moving away from them, depending on the local drug pressure.³⁷

Conclusion

In 2005, by the time of ACT adoption, and 2 years after the replacement of CQ, noticeable differences appeared in Bonoua and Samo in the distribution of genotypes conferring resistance to CQ and SP. The spread of mutated genotypes differed according to the settings and the demographics of each site. In the long run, high-level prevalence of resistant genotypes could compromise the efficacy of SP for IPTp in Bonoua and Samo, but also threaten the use of any other

alternative association with CQ as a partner drug for IPTp. Roughly 7–9 years after drug-policy changes, these findings need to be updated with a larger sample size, and more recent data need to be provided. Our results give a broad outline of the level of resistance to SP and CQ by the time of ACT introduction in Côte-d'Ivoire and are of interest for decision-makers or for global monitoring of malaria drug resistance via such networks as the Worldwide Antimalarial Resistance Network.³⁸

Acknowledgments

The authors thank the patients and their parents and guardians who agreed to participate in this study, and thank also all health authorities in the study sites for collaboration. The authors acknowledge the General Hospital of Bonoua, the Health Care Center of Samo village, and the medical staff for assistance in conducting the surveys and assays.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Penali KL, Koné M, Assi-Coulibaly L, Traore B, Lohoues-Yowell MO, Esse-Cadet M. La chloroquinorésistance in-vivo de *Plasmodium falciparum* chez le nourrisson et le jeune enfant dans l'agglomération d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *Med Afr Noire*. 1990;37(2):9–12.
- Charmot G, Amat-Roze JM, Rodhain F, Le Bras J, Coulaud JP. Abord géographique de la chloroquine-résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique tropicale. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1991;71:187–197.
- Nicolet I, Simon F, Le Bras J. Apparition de chloroquinorésistance a *Plasmodium falciparum* en Côte-d'Ivoire. *Bull Epidemiol Hebd*. 1987;41:163.
- Djaman JA, Kauffi PC, Yavo W, Basco LK, Kone M. Evaluation in vivo de l'efficacité thérapeutique de l'association sulfadoxine–pyrimethamine au cours du paludisme non compliqué chez les enfants de Yopougon (Abidjan, Côte-d'Ivoire). *Bull Soc Pathol Exot*. 2004;97:180–182.
- Henry MC, Eggelte A, Watson P, van Leeuwen D, Bakker DA, Kluin J. Response of childhood malaria to chloroquine and Fansidar in an area of intermediate chloroquine resistance in Côte-d'Ivoire. *Trop Med Int Health*. 1996;1(5):610–615.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme. *Document de politique nationale pour la lutte contre le paludisme*. Abidjan: Côte-d'Ivoire: Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique; 2005.
- Gardella F, Assi A, Simon F, et al. Antimalarial drug use in general populations of tropical Africa. *Malar J*. 2008;7:124.
- Frosch AEP, Venkatesan M, Laufer MK. Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malar J*. 2011;10:116.
- Granado S, Manderson L, Obrist B, Tanner M. Appropriating “malaria”: local responses to malaria treatment and prevention in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Med Anthropol*. 2011;30(1):102–121.
- Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev*. 2005;57:117–145.
- Djaman J, Ahibo H, Yapi FH, et al. Molecular monitoring of *falciparum* malaria isolates in Côte-d'Ivoire: genetic markers dhfr-ts, dhps, Pfprt, pfmdr-1 for antimalarial-drugs resistance. *Eur J Scientific Res*. 2010;40(3):461–470.

12. Penali LK, Faye O, Ndiaye JL, et al. Etude comparative de l'efficacité et de la tolérance de l'association sulfalène/pyriméthamine versus l'association sulfadoxine/pyriméthamine dans le traitement du paludisme simple en zone d'endémie. *Sci Med Afr*. 2009;1(2): 75–80.
13. Soulama I, Nébè I, Ouédraogo A, et al. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J*. 2009;8:135.
14. Sridaran S, McClintock SK, Syphard LM, Herman KM, Barnwell JW, Udhayakumar V. Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations. *Malar J*. 2010;9:247.
15. Meissner PE, Mandi G, Mockenhaupt FP, et al. Marked differences in the prevalence of chloroquine resistance between urban and rural communities in Burkina Faso. *Acta Trop*. 2008;105:81–86.
16. Matthys B, Koudou BG, N'goran EK, et al. Spatial dispersion and characterisation of mosquito breeding habitats in urban vegetable-production areas of Abidjan, Côte-d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104(8):649–666.
17. Kebede A, McCann JC, Kiszewski E, Ye-Ebiyo Y. New evidence of the effects of agro-ecologic change on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:676–680.
18. Asenso-Okyere K, Asante FA, Tarekegn J, Andam KS. *The Linkages Between Agriculture and Malaria: Issues for Policy, Research, and Capacity Strengthening*. Washington: International Food Policy Research Institute; 2009.
19. Willems S. *The Ivorian Pineapple: Social Action Within the International Pineapple Commodity Network [PhD thesis]*. Wageningen: Wageningen University; 2006.
20. Matthys B, Vounatsou P, Raso G, et al. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Côte-d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:1223–1231.
21. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, et al. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:953–959.
22. Colin JP, Kouamé G, Soro D. Outside the autochthon-migrant configuration. Access to land, land conflicts and inter-ethnic relationships in a former pioneer area (Lower Côte-d'Ivoire). *J Mod Afr Stud*. 2007;45:33–59.
23. Pearce RJ, Pota H, Evehe MSB, et al. Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med*. 2009;6(4):e1000055.
24. Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ, et al. Novel Pfdhps haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8): 3405–3410.
25. Henry M-C, Niangue J, Kone M. Quel médicament pour traiter le paludisme simple quand la chloroquine devient inefficace dans l'ouest de la Côte-d'Ivoire? *Med Trop*. 2002;62:55–57.
26. Djaman JA, Abouanou S, Basco L, Kone M. Limites de l'efficacité de la chloroquine et de la sulfadoxine-pyriméthamine au nord de la ville d'Abidjan Côte-d'Ivoire: étude couplée in vivo/in vitro. *Sante*. 2004;14:205–209.
27. Touré AO, Penali KL, Jambou R, et al. Sensibilité in vitro de *P. falciparum* à la quinine, l'Artésunate et la Chloroquine à Abidjan Côte-d'Ivoire. *Sante*. 2008;18(1):43–47.
28. Raso G, Lugnbühl A, Adjoua CA, et al. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. *Int J Epidemiol*. 2004;33:1092–1102.
29. Greenwood B. Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malar J*. 2010;13(9 Suppl 3):S2.
30. Parise ME, Ayisi JG, Nahlen BL, et al. Efficacy of sulfadoxine-pyriméthamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:813–822.
31. Talisuna OA, Langi P, Mutabingwa TK, et al. Intensity of transmission and spread of gene mutations linked to chloroquine and sulphadoxine-pyriméthamine resistance in falciparum malaria. *Int J Parasitol*. 2003;33:1051–1058.
32. Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, et al. Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease. *J Infect Dis*. 2005;192:1823–1829.
33. Skinner-Adams TS, McCarthy JS, Gardiner DL, Andrews KT. HIV and malaria co-infection: interactions and consequences of chemotherapy. *Trends Parasitol*. 2008;24:264–271.
34. Djaman JA, Mazabraud A, Basco L. Sulfadoxine-pyriméthamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007;101(2):103–112.
35. Djaman JA, Basco LK, Mazabraud A. Mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à Yopougon (Abidjan): étude in vivo de la sensibilité à la chloroquine et évaluation de la résistance à la pyriméthamine après analyse de la mutation ponctuelle du gène de la mutation dihydrofolate réductase. *Sante*. 2002;12:363–367.
36. Ouattara L, Bla KB, Assi SB, Yavo W, Djaman AJ. PFCRT and DHFR-TS sequences for monitoring drug resistance in Adzopé area of Côte-d'Ivoire after the withdrawal of chloroquine and pyriméthamine. *Trop J Pharm Res*. 2010;9(6):565.
37. Plowe CV. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103 Suppl 1:S11–S14.
38. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, et al. World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: Molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J*. 2007;6:121.

Infection and Drug Resistance

Publish your work in this journal

Infection and Drug Resistance is an international, peer-reviewed open-access journal that focuses on the optimal treatment of infection (bacterial, fungal and viral) and the development and institution of preventive strategies to minimize the development and spread of resistance. The journal is specifically concerned with the epidemiology of antibiotic

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/infection-and-drug-resistance-journal>

resistance and the mechanisms of resistance development and diffusion in both hospitals and the community. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Dovepress

Surveillance of Travellers: An Additional Tool for Tracking Antimalarial Drug Resistance in Endemic Countries

Myriam Gharbi^{1,2,3,4*}, Jennifer A. Flegg^{3,5}, Bruno Pradines^{6,7,8}, Ako Berenger⁹, Magatte Ndiaye¹⁰, Abdoulaye A. Djimdé¹¹, Cally Roper¹², Véronique Hubert¹³, Eric Kendjo¹⁴, Meera Venkatesan^{3,15}, Philippe Brasseur¹⁶, Oumar Gaye¹⁰, André T. Offianan⁹, Louis Penali³, Jacques Le Bras^{1,2,3,13}, Philippe J. Guérin^{3,4,5,17}, Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study

1 Unité Mixte de Recherche 216, Institut de Recherche et de Développement, Paris, France, **2** PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France, **3** WorldWide Antimalarial Resistance Network, Oxford, United Kingdom, **4** Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Sorbonne Paris Cité, Rennes, France, **5** Centre for Tropical Medicine & Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **6** Département d'Infectiologie de Terrain, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France, **7** Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Aix Marseille Université, Marseille, France, **8** Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France, **9** Malariology Department, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire, **10** Service de parasitologie, Faculté de Médecine et Pharmacie Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, **11** Malaria Research and Training Center & Department of Epidemiology of Parasitic Diseases, Faculty of Pharmacy University of Sciences Techniques and Technologies of Bamako, Bamako, Mali, **12** Pathogen Molecular Biology Department of Infectious Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom, **13** Centre National de Référence du Paludisme & Service de Parasitologie Mycologie, CHU Bichat-Claude Bernard APHP, Paris, France, **14** Centre National de Référence du Paludisme and Service de Parasitologie Mycologie, CHU Pitié-Salpêtrière APHP, Paris, France, **15** University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America, **16** UMR 198, Institut de Recherche pour le Développement, Dakar, Sénégal, **17** UMR S 707: Epidemiology Information Systems Modeling, INSERM and Université Pierre et Marie-Curie-Paris6, Paris, France

Abstract

Introduction: There are growing concerns about the emergence of resistance to artemisinin-based combination therapies (ACTs). Since the widespread adoption of ACTs, there has been a decrease in the systematic surveillance of antimalarial drug resistance in many malaria-endemic countries. The aim of this work was to test whether data on travellers returning from Africa with malaria could serve as an additional surveillance system of local information sources for the emergence of drug resistance in endemic-countries.

Methodology: Data were collected from travellers with symptomatic *Plasmodium falciparum* malaria returning from Senegal (n = 1,993), Mali (n = 2,372), Cote d'Ivoire (n = 4,778) or Cameroon (n = 3,272) and recorded in the French Malaria Reference Centre during the period 1996–2011. Temporal trends of the proportion of parasite isolates that carried the mutant genotype, *pfcr*t 76T, a marker of resistance to chloroquine (CQ) and *pf*dhfr 108N, a marker of resistance to pyrimethamine, were compared for travellers and within-country surveys that were identified through a literature review in PubMed. The *in vitro* response to CQ was also compared between these two groups for parasites from Senegal.

Results: The trends in the proportion of parasites that carried *pfcr*t 76T, and *pf*dhfr 108N, were compared for parasites from travellers and patients within-country using the slopes of the curves over time; no significant differences in the trends were found for any of the 4 countries. These results were supported by *in vitro* analysis of parasites from the field in Senegal and travellers returning to France, where the trends were also not significantly different.

Conclusion: The results have not shown different trends in resistance between parasites derived from travellers or from parasites within-country. This work highlights the value of an international database of drug responses in travellers as an additional tool to assess the emergence of drug resistance in endemic areas where information is limited.

Citation: Gharbi M, Flegg JA, Pradines B, Berenger A, Ndiaye M, et al. (2013) Surveillance of Travellers: An Additional Tool for Tracking Antimalarial Drug Resistance in Endemic Countries. PLoS ONE 8(10): e77775. doi:10.1371/journal.pone.0077775

Editor: Bruce Russell, National University of Singapore, Singapore

Received: May 7, 2013; **Accepted:** September 4, 2013; **Published:** October 30, 2013

Copyright: © 2013 Gharbi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported in part by a grant for doctoral studies to MG from the Doctoral Network of the École des Hautes Études en Santé Publique, Rennes, France and a grant for CNRpaludisme from Institut National de Veille Sanitaire, St Maurice, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: m.gharbi@yahoo.fr

Introduction

A decline in artemisinin efficacy has recently been confirmed in several regions in Southeast Asia [1,2,3]. Concerns are growing

about the potential for this artemisinin resistance to spread to sub-Saharan Africa, as it has previously been described for other antimalarial drugs. Indeed, resistance to chloroquine (CQ) and

sulfadoxine-pyrimethamine (SP) emerged relatively quickly after their introduction and subsequently spread from Asia to Africa [4,5]. Early detection of decreasing drug efficacy and the consequent updating of drug policies are crucial elements in the strategy to prevent the emergence or delay the spread of drug resistance [6,7]. In recent years, considerable effort has been made to improve epidemiological antimalarial resistance surveillance in countries with limited resources. Therapeutic efficacy studies remain the gold standard for guiding drug policy, as they take into account the complex interactions between the host, parasite and drug [8]. However, many settings in endemic countries lack the financial resources necessary to maintain a sustainable, accurate and reliable antimalarial resistance surveillance system, resulting in gaps in the spatial and temporal available information.

In recent years, globalization and a substantial increase in international travel and population mobility, have provided the potential for the rapid spread of infectious diseases and antimicrobial resistance [9]. More than 900 million international journeys are undertaken annually and this figure has been consistently rising over the years (United Nations World Tourism Organization: UNWTO).

Malaria is endemic in over 100 countries and represents an important infectious disease threat for these nations. Of the 125 million people travelling to malaria endemic countries each year, approximately 10,000 malaria infections were reported worldwide in returning travellers in 2010. Under-reporting is thought to be substantial and, hence, this number may, in reality, exceed 30,000 [10]. In Europe, a 10-fold increase in imported infections was reported from 1970 to 2000 (from 1,500 to about 15,000 cases) before decreasing to about 6,000 cases in 2010 (<http://data.euro.who.int/cisid/>); most of these cases were reported in France or the United Kingdom [11]. Travellers who return from endemic countries infected with malaria often present with low immunity against the parasites and there is no risk of re-infection, so they are a particularly valuable source of information.

In fact, historically, the emergence of CQ resistance in Africa was mainly detected through surveillance of travellers (Figure 1, Table 1). The current study was undertaken to test the idea that surveillance of parasites from travellers can be used to accurately assess the evolution of antimalarial drug resistance and provide complementary information to existing monitoring. As a proof of concept, the aim was to compare trends in molecular and *in vitro* markers of drug resistance observed in the imported malaria population with the trends described in field studies.

Materials and Methods

Data Collection

The studies were conducted by the National Reference Centre for Malaria (CNR), Paris, France and investigators from the four endemic countries, in collaboration with the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN).

Data from travellers. Data were collected from travellers with symptomatic *Plasmodium falciparum* malaria returning from malaria-endemic countries during the period 1996–2011. These cases were reported to the French CNR by one of the 80 hospitals participating in the sentinel network for malaria which covers about half of the cases diagnosed in France. All the travellers included in this study must have visited a malaria-endemic African country in the two months prior to diagnosis and presented with a *P. falciparum* infection biologically confirmed by thin and thick blood smear. Basic demographic, epidemiologic, clinical, and parasitological information as well as response to treatment, previous malaria infection and travel history information were

systematically reported. Blood samples were only collected from hospitals which document anti-malarial drug resistance on a systematic basis in all *Plasmodium* positive diagnosis, before treatment, for molecular and *in vitro* analyses.

Molecular markers associated with resistance to CQ and pyrimethamine and CQ susceptibility *in vitro* were the tools used to compare antimalarial drug resistance trends between travellers and field studies.

No informed consent was required for this study as the procedures described here were part of the French national surveillance system of malaria. In 2006, the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL), France, approved the electronic-based utilisation of patient-level data collected through the CNR's questionnaire. We did not receive ethical approval or waiver to perform this secondary research on samples collected as a part of government surveillance for communicable diseases (Loi n° 2004-806 art.16, 21, 9 August 2004, Journal Officiel 11 August 2004). However, ethical aspects have been respected according to the French regulation (article L.1211-2, L.1111-7, L.1413-4 and L.1413-5 Code de la Santé Publique). Also an information note, which explained that the collected blood samples could be used for further research analyses, was provided to the patients who had the possibility to refuse; and the samples were anonymised for this study.

Data within-country. A literature review was performed in PubMed for publications on malaria from African endemic countries during the period 1996–2011. The search terms [*country name*+(pfprt OR chloroquine resistance)] and [*country name*+(DHFR OR sulfadoxine-pyrimethamine resistance OR sulfadoxine pyrimethamine resistance)] were used.

After performing a sample size calculation (see below sample size calculation section), four African countries, Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and Cameroon were included in this study. They had sufficiently large numbers of both travellers and field molecular data, from 1996–2011, for a meaningful comparison.

The collaboration of investigators within the four targeted countries, facilitated by WWARN, enabled the collation and standardisation of published field data and the identification and standardisation of unpublished field data. The field studies used for the analyses are summarized in Table 2.

Laboratory Analysis of Parasites

Molecular analysis. Two molecular markers, *pfprt* 76 for CQ resistance and *pfdhfr* 108 for pyrimethamine resistance, were used in this study to compare the trends between travellers and field data. Although the presence of these two markers does not perfectly correlate with treatment failure, each is a good proxy of the intrinsic resistance of the parasite [12,13]. They are used here as a proof of concept since they have been widely and consistently collected in both field studies and travellers surveillance over the period of interest. Due to the availability of travellers' data, the time period of 2000–2011 was studied for *pfprt* 76T, while the time period of 1996–2011 was used for *pfdhfr* 108N.

For molecular analyses of parasites from travellers, DNA was extracted from blood samples of *P. falciparum*, using the QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen® before 2008 and the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, Roche after 2008. PCR and subsequent allele-specific restriction analyses were performed to identify polymorphic codons of interest at the *pfprt* 76 locus (Lys to Thr) and the *pfdhfr* 108 locus (Ser to Asn) [14].

For field studies, the genotyping methods differed slightly between studies. The detailed method for each study was described in the corresponding publication (see Table 2 for the references to the studies).

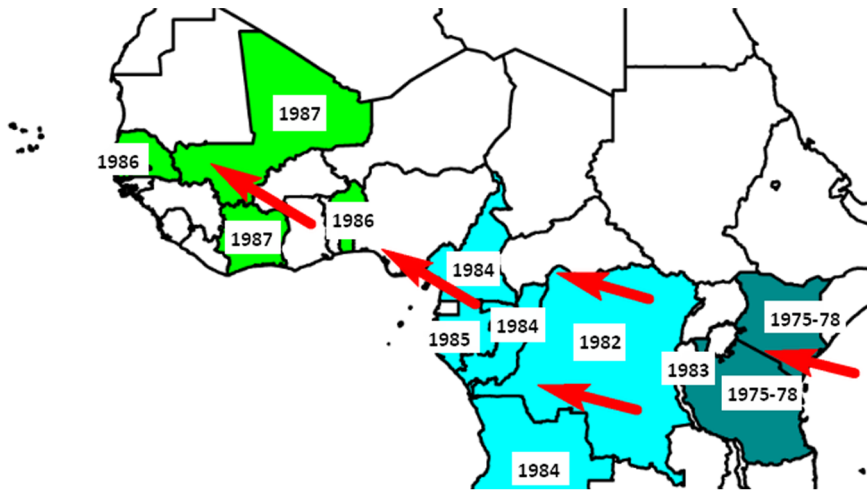


Figure 1. Map of Africa illustrating the emergence of CQ resistance in East, Central and West Africa detected through travellers' surveillance from the late 1970s to the early 1980s. The dates of detection of index cases are displayed. The red arrows show the spread of antimalarial resistance from East Africa to West Africa.
doi:10.1371/journal.pone.0077775.g001

Only “pure” *pfprt* 76T and *pfldhfr* 108N infections among the total number of samples tested were included to improve comparability of the allele prevalence calculated between studies. Indeed, genotyping methods for detecting mixed infections vary in sensitivity across studies. There is not clear evidence that patients living in endemic countries are more likely to carry mixed alleles (mutant and sensitive) than travellers returning from endemic countries as the number of mosquitoes' bites is not the only factor to consider and the presence of mixed infections is possible after only one bite [15].

In vitro assay. For the *in vitro* susceptibility tests, only data from Senegal were analysed in this study because there were sufficient available data for parasites from both the travellers and within-country isolates over the complete period of interest.

For susceptibility tests of parasites from travellers, the following methods were used. The batches of plates were validated on the CQ-susceptible 3D7 reference strain and the CQ-resistant W2 reference strain using the standard 42-hour ^3H -hypoxanthine

uptake inhibition method in controlled atmospheric conditions in the incubator (5% CO_2 , 10% O_2 and 85% N_2) [16,17]. The isotopic microtests were performed, aliquoting 200 μl /well of the suspension of fresh parasitized erythrocytes into 96-well plates pre-dosed with CQ. Radioactivity incorporated by the parasites was measured using a scintillation counter. The CQ susceptibility was calculated as the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of CQ of the isolates tested [18,19]. The drug concentration that inhibited 50% of parasite growth (IC_{50}) was estimated by using nonlinear regression to fit an inhibitory sigmoid E_{max} model [20]. The *In Vitro* Analysis and Reporting Tool (IVART) enabled the transformation, standardization and analysis of the data [21].

For within-country surveys, the *in vitro* methods differed between studies and were described in the publications, which are referenced in Table 2. However, the measurement of the drug susceptibility of fresh *P. falciparum* parasites was mainly performed by isotopic assays using the ^3H -hypoxanthine uptake inhibition method. The *in vitro* CQ susceptibility was determined by a *P.*

Table 1. First published cases of CQ resistance in Africa through travellers' surveillance*.

Country	Date case	Date published	Country of detection	Reference
Kenya	1978	1979	Denmark	[29]
East Africa (Kenya-Tanzania)	1975	1979	United States	[30]
Democratic Republic of the Congo (Zaire)	1982	1983	United States	[31]
Burundi	1983	1984	France	[32]
Republic of the Congo	1984	1985	France	[33]
Cameroon	1984	1985	France	[34]
Angola	1984	1984	Denmark	[35]
Gabon	1985	1986	United States	[36]
Benin	1986	1986	France	[37]
Senegal	1986	1987	Sweden	[38]
Cote d'Ivoire	1987	1988	France	[39]
Mali	1987	1988	France	[40]

*The within-country studies which detected the emergence of CQ resistance in other parts of Africa during this time period are not shown here.
doi:10.1371/journal.pone.0077775.t001

Table 2. Summary of the molecular and *in vitro* field studies in the four endemic countries included in the analysis (both published and unpublished).

	Country	Site	Age population	Year of study	Reference
Molecular marker analysis					
<i>Pfcr76</i>	Senegal	Pikine	≥5 ya	2000	[41]
		Pikine	≥18ya	2001	[42]
		Thiadiaye	Pregnant women	2002	[43]
		Dakar	3–65ya	2002	[44]
		Pikine	≥3ya	2004	[45]
		Dakar	All	2004	[46]
		Thies	All	2007	[47]
		Dakar	All	2009–10	[48]
		Central Senegal (3 districts : Mbour, Fatick, Bambey) and Southern Senegal (3 districts : Tambacounda, Velingara, Saraya)	<10 ya	2009–11	[49]
		Dakar	all	2010–2011	Pradines, unpublished data
Mali	Kolle	<5 ya	2002–03	[50]	
	Bougoula-Hameau	>6 mths	2002–04	[51]	
	Bancouma, Monteourou, Bandiagara, Faladie, Koulikoro Ba, Sirakoro-meg, Niema, Kalebougou, Markakoungo, Dimbal, Kafana, Siekorole, Toguel, M'pessoba Banamba, N'debougou	all	2002–04	[52]	
	Kangaba et kela	>6 mths	2001–03	[53]	
Cote d'Ivoire	Bandiagara, Faladje Kolle Pongenon	all	2010	Djimé, unpublished data	
	Anonkoua-koute (Abidjan), Ayamé, Dabakala	all	2003–08	Ako, unpublished data	
	Bonoua and Samo	<5 ya	2005	[54]	
	Abidjan (2 districts: Yopougon and Adjamé)	Children	2006	[55]	
	Adzope	Children	2007	[56]	
Cameroon	Maroua, Ndop, Bafoussam, Hévécam	<5 ya	2000–01	[57]	
	Yaoundé	>12 ya	2000–01	[58]	
	Garoua, Yaounde, Mutengene	<5 ya	2004–06	[59]	
	Yaoundé, Mfou (suburb of Yaoundé)	All ages	2005–08	[60]	
<i>Pfdhfr 108</i>	Senegal	Dielmo, Sine Saloum	All	1996–99	[61]
		Pikine, Tambacounda, Thies	≥5 ya	2000–03	[62]
		Dakar	3–65 ya	2002	[44]
		Dakar	<5 ya	2006–08	[63]
		Dakar	all	2009–10	[47]
	Mali	Tieneguebougou	2–12 ya	1996	[64]
		Kidal	All	1999	[65]
		Bandiagara	5–15 ya	2000	[66]
		Kolle	<5 ya	2002–03	[50]
	Cote d'Ivoire	Bongoula-Hameau	>6 mths	2002–04	[50]
Kolokani		<5 ya	2006–07	[67]	
Yopougon		<5 ya	2000–01	[68]	
Anonkoua-koute (Abidjan), Ayamé, Dabakala			2003–08	Ako, unpublished data	
Bonoua and Samo		<5 y	2005	[54]	
Abidjan (2 districts: Yopougon and Adjamé)		Children	2006	[55]	
Adzope		Children	2007	[56]	
Cameroon	Bertoua, Douala, Eseka, Yaounde	<5 ya	1999	[69]	

Table 2. Cont.

Country	Site	Age population	Year of study	Reference	
	Bafoussam, Bertoua, Djoum, Garoua, Hevecam, Manjo, Maroua, Mengang, Ndop, Ngaoundere, Sangmelima, Yaounde	<10 ya	1999–03	[70]	
	Dschang, Fontem, Limbe, Nkambe	<10 ya	2002–03	[71]	
	Garoua, Mutengene, Yaounde	<5 ya	2004–06	[59]	
	Yaounde	≥12 ya	2001–05	[72]	
In vitro susceptibility test					
chloroquine	Senegal	Mlomp	1996–98	[73]	
		Pikine, Dielmo, NDiop	1996	[74]	
		Dielmo, NDiop	1997	[75,76]	
		Pikine	≥5 ya	2000	[41]
		Pikine	≥18 ya	2001	[42]
		Dakar	2002	[44]	
		Dakar	2009–2010	[77]	

doi:10.1371/journal.pone.0077775.t002

falciparum Lactate DeHydrogenase (pLDH) ELISA assay in four studies.

Statistical Analysis

Sample size calculation. In order to select eligible countries with enough data per year for significant molecular analysis, a sample size calculation was first performed. The basic comparison of the trends used a simple logistic regression model. The prevalence of isolates from traveller samples that carried a mutant allele (P_t) or from studies on field samples (P_f) was the metric used. In the models: S .

$$\text{logit}(P_t) = a_t + S_t X$$

$$\text{logit}(P_f) = a_f + S_f X$$

where X is the time covariate and a the intercept, the null hypothesis of equal temporal slopes was tested [22]. That is,

$$H_0 : \text{slope in travellers' data } (S_t) = \text{slope in field data } (S_f)$$

A two sided t-test with a test significance level of $\alpha = 0.05$, a power of $1 - \beta = 0.80$ and an effect size of $\delta = 0.15$ was used. The total sample size required for showing a significant difference between the slopes S_t and S_f was $n = 642$ isolates for each data type (field and travellers data) per country.

Logistic regression. For the molecular analysis, a logistic regression model with time as a linear covariate was fitted to the prevalence of the mutant isolates (separately, for the *pfert* 76 and *pfldhfr* 108 data) for the travellers and field studies, for each country. Given the probability of the mutant isolates, the observed number of mutant isolates in each year was assumed to be binomially distributed. The estimated slope of the fitted logistic regression curve for the travellers and field data, the 95% confidence intervals for the slopes and whether the slopes differ significantly from each other are presented (see figures in the results section).

For the *in vitro* susceptibility analysis, a Generalized Linear Model (GLM) with a log-link function was fitted to the travellers and field data for the period 2000–2011. The slopes of the changes in CQ susceptibility for the two datasets were assessed to determine whether they differed significantly from null (0) and whether they differed significantly from each other.

Software. All statistical analyses were performed using Stata version 11 for Windows (Stata Corp, College Station, TX, USA) and R version 2.10 (R – project).

Results

Four African countries had sufficient numbers of field and traveller derived isolates to allow meaningful comparisons between the two populations: Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and Cameroon. The characteristics for the field studies are summarised in Table 2 for each publication. A total of 23 studies were included for *pfert* 76 analysis over the 2000–2011 period, mainly from Senegal; 21 studies for *pfldhfr* 108 analysis for 1996–2010 and 8 studies from Senegal for the *in vitro* analysis over the same period. The characteristics of the patients differed between studies regarding the population age and the study settings (urban or rural area) but this heterogeneity was observed for the four countries.

The median patient age for travellers experiencing malaria after their return to France was 31 years, with 79% older than 15 and 61% of the travellers had visited friends and relatives in endemic countries for more than one month. Only 38% reported prophylaxis intake during their travel and most patients presented with uncomplicated malaria (95%) (Table 3). No differences among these characteristics were observed among the four countries except for gender; a majority of travellers to Senegal and Mali were male.

Between 2000–2011, 2,874 *P. falciparum* positive isolates were collected from travellers for analysis of the *pfert* 76 allele prevalence and 3,351 isolates for analysis of the *pfldhfr* 108 allele prevalence between 1996–2011. Between 1996 and 2011, 305 fresh blood samples were collected from travellers, and tested in Paris or Marseille to measure susceptibility to CQ *in vitro*.

Figure 2 and Table 4 summarize the temporal trends in the prevalence of the *pfert* 76T mutant isolates (associated with CQ

Table 3. Characteristics of travellers with malaria returning from Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and Cameroon and reported in France during the period from 2000 to 2011.

Travellers	Senegal (n = 1,993)*	Mali (n = 2,372)*	Cote d'Ivoire (n = 4,778)*	Cameroon (n = 3,272)*
Median age (year) [Min-Max]	30 [0–94]	31 [0–76]	30 [0–83]	33 [0–87]
Gender ratio (Male/Female)	2.47	2.20	1.40	1.15
Chemoprophylaxis				
Yes n (%)	746 (38)	959 (41)	1,955 (41)	1,048 (32)
Duration of stay				
≤2 weeks n (%)	218 (13)	152 (8)	457 (12)	439 (16)
2–4 weeks n (%)	356 (21)	361 (18)	1,150 (30)	868 (33)
1–3 months n (%)	699 (41)	928 (48)	1,221 (32)	679 (25)
>3 months n (%)	428 (25)	498 (26)	1,021 (26)	688 (26)
Purpose of travel				
Tourism n (%)	322 (18)	251 (12)	514 (12)	397 (13)
Visit friends and relatives n (%)	1,108 (61)	1,520 (71)	2,482 (58)	1,738 (59)
Severe malaria**				
Yes n (%)	136 (7)	123 (5)	225 (5)	177 (5)

*Numbers may not add to totals because of missing information.

**Severe malaria are cases of imported malaria that fulfilled at least one criteria of the WHO clinical and laboratory classification of severity [78].

doi:10.1371/journal.pone.0077775.t003

resistance) in each of the targeted countries. The prevalence of the *pfprt* 76T mutant genotype significantly decreased for travellers between 2000 and 2011 in Senegal ($S_t = -0.17$, $p < 10^{-3}$), Cote d'Ivoire ($S_t = -0.15$, $p < 10^{-3}$) and less dramatically in Cameroon ($S_t = -0.09$, $p < 10^{-3}$). However, over that same period, no overall decrease was observed in isolates from Mali ($S_t = -0.01$, $p = 0.72$).

After comparing the slopes of the trends for the isolates from travellers (S_t) and from locally studied parasites (S_f), no significant differences were observed between 2000 and 2011 in Senegal ($S_t = -0.17$ versus $S_f = -0.21$, $p = 0.58$), Mali ($S_t = -0.01$ versus $S_f = 0.01$, $p = 0.89$), Cote d'Ivoire ($S_t = -0.15$ versus $S_f = -0.22$, $p = 0.58$) and Cameroon ($S_t = -0.09$ versus $S_f = 0.05$, $p = 0.26$) (Table 4, Figure 2). After performing a power calculation on the

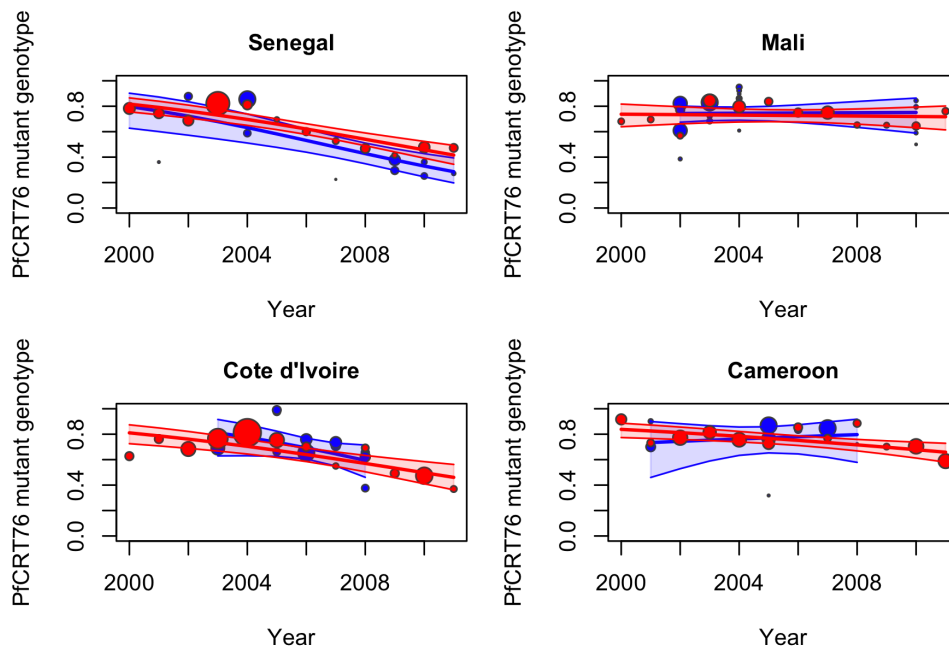


Figure 2. Observed data, fitted model (by logistic regression) and 95% confidence interval (shaded area) for the prevalence of the *pfprt* 76 mutant isolates from 2000 to 2011 for travellers (red) and field studies (blue) for A-Senegal, B-Mali, C-Cote d'Ivoire and D-Cameroon. Each data point represents the prevalence of resistant isolates per year for travellers' data and per study for field studies, where the size of the circle is proportional to the number of isolates in the sample.
doi:10.1371/journal.pone.0077775.g002

Table 4. Comparison between travellers and field data for the *pfprt* 76 and *pfdhfr* 108 molecular markers and for the CQ *in vitro* susceptibility in Senegal.

	Country	Travellers Slope [95% CI*]	Field Study Slope [95% CI]	p-value**
<i>Pfprt</i> 76	Senegal	-0.167 [-0.219; -0.115]	-0.208 [-0.312; -0.105]	0.575
	Mali	-0.009 [-0.082; 0.063]	0.005 [-0.106; 0.116]	0.885
	Cote d'Ivoire	-0.146 [-0.215; -0.078]	-0.215 [-0.463; 0.032]	0.578
	Cameroon	-0.090 [-0.146; -0.033]	0.050 [-0.220; 0.321]	0.264
<i>Pfdhfr</i> 108	Senegal	0.117 [0.088; 0.147]	0.148 [0.088; 0.209]	0.386
	Mali	0.182 [0.124; 0.240]	0.119 [0.086; 0.152]	0.116
	Cote d'Ivoire	0.083 [0.052; 0.113]	0.132 [-0.025; 0.289]	0.484
	Cameroon	0.213 [0.115; 0.311]	0.130 [-0.155; 0.415]	0.753
CQ <i>in vitro</i> analysis	Senegal	-0.050 [-0.085; -0.015]	-0.028 [-0.059; 0.002]	0.264

*CI = confidence interval,

**The p-value indicates whether the fitted slopes for travellers data and field studies were significantly different from each other.

doi:10.1371/journal.pone.0077775.t004

four previous tests, the probabilities of rejecting the null hypothesis, $S_i = S_j$, when it is false, were between 92 and 96%. These data derived from studies of parasites from returning travellers reflected accurately the trends of the prevalence of molecular markers of CQ resistance that were occurring in the countries in which the travellers acquired their malaria.

Changes in CQ susceptibility were also assessed using the *in vitro* response of isolates. From 1996 to 2011 the geometric mean of the IC_{50} for CQ of the isolates tested *in vitro* decreased in isolates from travellers and those studied in Senegal (Table 4, Figure 3). The geometric means of the IC_{50} values measured for the isolates from travellers were lower than those measured in Senegal. However, the slopes showing the trends did not differ significantly ($S_i = -0.05$ versus $S_j = -0.03$, $p = 0.26$) with a power of 94%. In this case, as well, the data gathered from travellers was an accurate reflection of the trend among parasite populations in the country of origin.

The increase of the molecular marker *pfdhfr* 108N has been commonly associated with an increase of pyrimethamine resistance for more than fifteen years [23]. When this parameter was compared between travellers and field-derived isolates, a significant increase in the *pfdhfr* 108N genotype was observed in all 4 countries over the period from 1996–2011: Senegal ($S_i = 0.12$,

$p < 10^{-3}$), Mali ($S_i = 0.18$, $p < 10^{-3}$), Cote d'Ivoire ($S_i = 0.08$, $p < 10^{-3}$) and Cameroon ($S_i = 0.21$, $p < 10^{-3}$) (Table 4, Figure 4). For this comparison as well, no significant difference was observed in the trends of the molecular marker *pfdhfr* 108N when data from travellers (S_i) and field-derived (S_j) isolates were compared for samples taken between 1996 and 2011: Senegal ($S_i = 0.12$ versus $S_j = 0.15$, $p = 0.39$), Mali ($S_i = 0.18$ versus $S_j = 0.12$, $p = 0.12$), Cote d'Ivoire ($S_i = 0.08$ versus $S_j = 0.13$, $p = 0.48$) and Cameroon ($S_i = 0.21$ versus $S_j = 0.13$, $p = 0.75$) (Table 4, Figure 3). The powers of the four comparative analyses ranged between 91 and 97%.

Thus, all three measures of changes in prevalence of molecular markers and *in vitro* parasites resistance to CQ and pyrimethamine demonstrate that information from parasites imported by travellers was an accurate measure of the changes in parasites within the 4 countries studied.

Discussion

This study suggests that the surveillance of travellers may be used for monitoring antimalarial drug resistance in endemic countries. The proof of concept was demonstrated using the prevalence of two molecular markers, *pfprt* 76 and *pfdhfr* 108, and *in vitro* susceptibility for CQ. In this study, no significant difference between the trends of antimalarial drug resistance for travellers' and field data were observed over more than 10 years. A decrease of the prevalence of the *pfprt* 76T mutant genotype was observed over a period of 10 years in travellers returning from Senegal, Cote d'Ivoire and Cameroon, whilst this prevalence remains stable in Mali. An increase of mutant genotype isolates for *pfdhfr* 108 was observed in the four countries of West and Central Africa. The *in vitro* CQ susceptibility results supported the molecular results for Senegal. The trend in *pfprt* 76 is downward while the trend in *pfdhfr* 108 is upward. The fact that screening travellers was able to detect temporal trends in opposite directions strengthens the proof of concept significantly.

Sustainable, reliable and systematic monitoring of drug efficacy is needed for tracking resistance [24]. Monitoring antimalarial drug resistance is based on clinical assessment and biological assays as part of a clinical trial [25]. Since the emergence of resistance to CQ, and then later to SP, capacities to conduct such monitoring in endemic countries have substantially improved, but remain very heterogeneous. In particular regions, human and/or technical resources are limited and, as such, conducting a clinical trial for the purpose of surveillance has competed with other high priorities

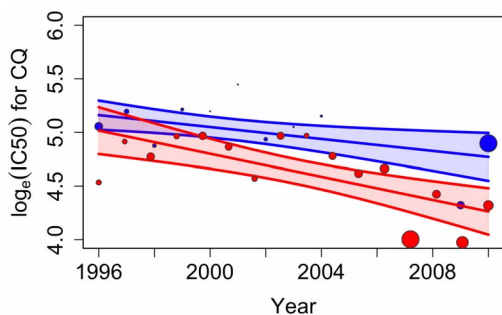


Figure 3. Observed data, fitted model (by Generalized Linear Model) and 95% confidence interval (shaded area) for the *in vitro* CQ response (IC_{50}) isolates from 1996 to 2011 for travellers (red) and field studies (blue) from Senegal. Each data point represents the \ln (mean IC_{50}) per year for travellers' data and per study for field studies, where the size of the circle is proportional to the number of isolates in the sample.

doi:10.1371/journal.pone.0077775.g003

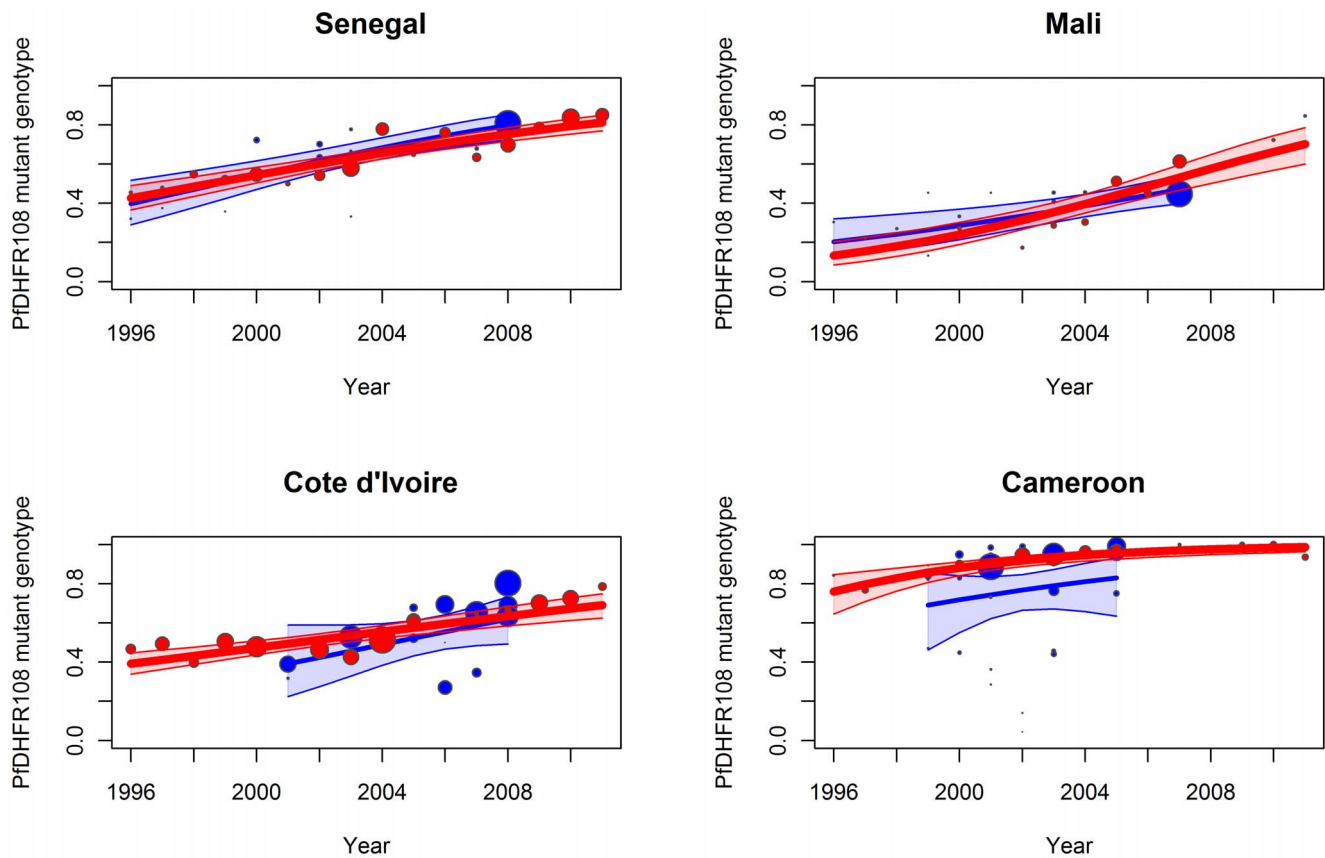


Figure 4. Observed data, fitted model (by logistic regression) and 95% confidence interval (shaded area) for the prevalence of the *pfdhfr* 108 mutant isolates from 1996 to 2011 for travellers (red) and field studies (blue) for A-Senegal, B-Mali, C-Cote d'Ivoire and D-Cameroon. Each data point represents the prevalence of resistant isolates per year for travellers' data and per study for field studies, where the size of the circle is proportional to the number of isolates in the sample. doi:10.1371/journal.pone.0077775.g004

that Ministries of Health must contend with and has not been systematically conducted.

Previous studies highlight the usefulness of travellers' surveillance as an early warning detection system for emergence or re-emergence of communicable diseases [26,27,28]. Travellers' surveillance has proven in the past to be an effective early alert system for detecting the emergence of CQ resistance (Table 1).

One strength of using travellers as a sentinel system of resistance is that detection of clinical therapeutic failure due to resistance is facilitated in this non immune population with a low risk of re-infection. Moreover, the French Malaria Reference Centre use standardized methods for prospectively collecting reliable information.

This study does have several limitations. First, due to the complexity of collecting laboratory data systematically, consistently and over a long period of time in both populations, travellers and field studies, only four countries and two molecular markers have been used in this proof of concept. Second, precise information regarding the location of infection within each country could not be collected for *P. falciparum* infected travellers returning from endemic countries. However, travellers did not visit all parts of a country and they were more likely to frequent particular places such as touristic and/or, or business-oriented locations. The reported information was highly dependent on factors such as the areas that were visited, the period of travel, migration history and the political context in endemic areas. Of course, these factors can also impact information on exact

locations where patients acquire their infections within the country, as well. Perhaps more importantly, the travellers in this work were not representative of the native population in that their baseline characteristics differ, including age, immune status and parasitemia before treatment. Finally, especially for the field studies, different approaches were used for determining the molecular markers of resistance and the *in vitro* susceptibility for CQ. The heterogeneity between methods is encouraging WWARN to standardise approaches and to develop common tools like IVART [21].

However, these limitations do not diminish the clarity of the outcome presented here. Surveillance of parasites from travellers provided an accurate picture of events occurring in the field. This does not suggest that this approach should replace studies conducted in endemic countries. Rather, information from travellers can be used as an additional surveillance system.

Given the utility, surveillance of travellers can be useful in tracking resistance to ACTs, as well. Currently, only the response to the long-acting partner drugs, can be assessed, but if putative molecular markers are defined, tracking of resistance to the artemisinin component can also be added. The collaboration between Ministries of Health in endemic countries and the malaria reference centres in non-endemic countries for sharing and validating collected information should be reinforced and facilitated.

Due to the length of time between a field study and the publication of results, data collected from imported cases may be

available in a more timely manner and, as such, could be used for early alert of emerging resistance. The complexity of the available tools for assessing drug efficacy and monitoring resistance highlights the importance of a standardized and coordinated approach. The follow-up of imported cases in several non-endemic countries should also enable the collaborators to track the evolution of resistance to antimalarial drugs at an international scale and thus provide novel information of value to policy makers.

The goal of this work was to validate the use of international traveller surveillance systems, for detecting the emergence of antimalarial drug resistance and for following resistance trends where local information is not otherwise available and/or sufficient. Easy access to reproducible and standardized data should be implemented. The existing health international, European or American institutions (WHO, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), US Centres for Disease Control and Prevention (CDC Atlanta) and the different networks for infectious diseases surveillance in travellers (TropNet Europe, EuroTravNet, GeoSentinel) should be used for facilitating the coordination and data sharing between national surveillance systems [26,27,28].

Conclusions

This study has not shown different trends in antimalarial drug resistance between travellers and field studies. An international travellers' database can be used as an additional surveillance system to assess and monitor the emergence of drug resistance in endemic areas where information is limited.

Acknowledgments

We thank Prof Carol Sibley for critical reading of the manuscript. The authors would like to thank Sandie Menard and Antoine Berry for generously providing additional information and data from their previous publication. The authors would like to thank Fabrice Legros (deceased) for his contribution to the study.

This article has been submitted on behalf of the National Malaria Reference Centre Study Group

Ahmed Aoubacar (Institut de parasitologie et de pathologie tropicale, Strasbourg, France), Patrice Agnamey (Service de Parasitologie, CHU Amiens, France), Adela Angoulvant (Service Parasitologie, APHP Bicêtre, Paris, France), Patricia Barbut (Laboratoire de Biologie Médicale, CH Longjumeau, France), Didier Basset (Service Parasitologie, CHU Montpellier, France), Ghania Belkadi (Service Parasitologie, APHP Saint Antoine, Paris, France), Anne-Pauline Bellanger (Service Parasitologie, CHRU Jean Minjoz, Besançon, France), Dieudonné Bemba (Service Microbiologie, APHP Bondy-Jean Verdier, Paris, France), Françoise Benoit-Vical (Service Parasitologie, CHU Ranguel, Toulouse, France), Antoine Berry (Service de Parasitologie, CHU Ranguel, Toulouse, France), Marie-Laure Bigel (Laboratoire Biologie Médicale, CH François Quesnay, Mantes-La-Jolie, France), Julie Bonhomme (Service Microbiologie, CHU Caen, France), Françoise Botterel (Service de Parasitologie, APHP Henri Mondor, Créteil, France), Olivier Bouchaud (Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Avicenne-Bobigny, Paris, France), Marie-Elisabeth Bougnoux (Service Microbiologie, APHP Necker, Paris, France), Patrice Bourée (Service Parasitologie, APHP Bicêtre, Paris, France), Laurent Bret (Service Microbiologie, CHR Orleans, France), Pierre Buffet (Service Parasitologie, APHP Pitié-Salpêtrière, Paris, France), Bernadette Buret (Laboratoire Biologie Médicale, CH Niort, France), Sylviane Chevrier (Service Parasitologie, CHU Rennes, France), Bernadette Cuisenier (Service Parasitologie, CHU Dijon, France), Martin Danis (Service de Parasitologie, APHP Pitié-Salpêtrière, Paris, France), Marie-

Laure Dardé (Service Parasitologie, CHU Limoges, France), Ludovic De Gentile (Service de médecine tropicales, CHU Angers, France), Jean-Marie Delarbre (Service Microbiologie, CH Mulhouse, France), Pascal Delaunay (Service Parasitologie, CHU Nice, France), Anne Delaval (Service Microbiologie, CHG Aulney-sous-Bois, France), Jean Delmont (Service Médecine Tropicale et Infectieuse, Hôpital Nord, Marseille, France), Guillaume Desoubeaux (Service Parasitologie, CHRU de Tours, France), Michel Develoux (Service Parasitologie, APHP Saint Antoine, Paris, France), Jean Dunand (Service Microbiologie et Hygiène, APHP Ambroise Paré, Paris, France), Rémy Durand (Service Parasitologie, APHP Avicenne-Bobigny, Paris, France), Odile Eloy (Service Parasitologie, CH Versailles, France), Nathalie Fauchet (Service Microbiologie, CHI Créteil, France), Bernard Faugere (Service Parasitologie, APHM Timone, Marseille, France), Albert Faye (Service Pédiatrie, APHP Robert Debré, Paris, France), Pierre Flori (Service Parasitologie, CHU Saint-Etienne, France), Chantal Garabedian (Laboratoire de Maladies Infectieuses et Hygiène, CH Pays d'Aix, Aix-en-Provence, France), Françoise Gay-Andrieu (Service Parasitologie, CHU Nantes, France), Nadine Godineau (Service Microbiologie, CHG Delafontaine, St Denis, France), Pascal Houzé (Laboratoire Biochimie, APHP Saint Louis, Paris, France), Sandrine Houzé (Service Parasitologie, APHP Bichat-Claude Bernard, Paris, France), Houria Ichou (Service Microbiologie et Hygiène, APHP Louis Mourier, Paris, France), Laurence Lachaud (Service Microbiologie, CHU Nîmes, France), Magalie Lefevre (Laboratoire de Biologie Médicale, CH Creil, France), Gwenaél Le Moal (Service Maladies Infectieuses, CHU Poitiers, France), Marie Machouart (Service Parasitologie, CHU Nancy, France), Denis Malvy (Service Parasitologie, CHU Bordeaux, France), Sophie Matheron (Service Maladies Infectieuses et Tropicales, APHP Bichat-Claude Bernard, Paris, France), Danièle Maubon (Service Parasitologie, CHU Grenoble, France), Bruno Megarbane (Service de Réanimation Médicale et Toxicologique, APHP Lariboisière, Paris, France), Sandie Menard (Service de Parasitologie, CHU Ranguel, Toulouse, France), Laurence Million (Service Parasitologie, CHRU Jean Minjoz, Besançon, France), Muriel Mimoun-Aiach (Service Microbiologie, APHP Trousseau, Paris, France), Philippe Minodier (Service Pédiatrie, APHM Hôpital Nord, Marseille, France), Gilles Nevez (Service Parasitologie, CHU Brest, France), Philippe Parola (Service Maladies Infectieuses et Tropicales APHM Hôpital Nord, Marseille, France), Daniel Parzy (Service Parasitologie, IMTSSA, Marseille, France), Olivier Patey (Service Maladies Infectieuses et Tropicales, CHI Villeneuve Saint Georges, France), Pierre Patoz (Laboratoire Biologie Médicale, CH Tourcoing, France), Pascale Penn (Service Microbiologie, CH Le Mans, France), Alice Perignon (Service de maladies infectieuses et tropicales, APHP Pitié-Salpêtrière, Paris, France), Stéphane Picot (Service Parasitologie, CHU Lyon, France), Jean-Etienne Pilo (Service de Santé et des Armées Maladie Infectieuses et Tropicales, HIA Begin, Saint Mandé, France), Isabelle Poilane (Service Microbiologie, APHP Bondy Jean Verdier, Paris, France), Denis Pons (Service Microbiologie, CHU Clermont Ferrand, France), Christophe Rapp (Service de Santé et des Armées Maladie Infectieuses et Tropicales, HIA Begin, Saint Mandé, France), Marie-Catherine Receveur (Service Médecine, CHU Bordeaux, France), Claudine Sarfati (Service Parasitologie, APHP Saint-Louis Lariboisière, Paris, France), Yaye Senghor (Service Parasitologie, APHP Bobigny Avicenne, Paris, France), Jean-Yves Siriez (Service Pédiatrie, APHP Robert Debré, Paris, France), Nicolas Taudon (Service Parasitologie, IMTSSA, Marseille, France), Marc Thellier (Service Parasitologie, APHP Pitié-Salpêtrière, Paris, France), Maxime Thouvenin (Service Microbiologie, CH Troye, France), Dominique Toubas (Service Parasitologie, CHU Reims, France)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG PJJ JL. Performed the experiments: MG JAF BP AB MN AAD VH PB OG ATO LP. Analyzed the data: MG JAF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MG CR VH EK MV. Wrote the paper: MG PJJ JL.

References

- Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, et al. (2012) Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379: 1960–1966.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, et al. (2009) Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361: 455–467.

3. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, et al. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359: 2619–2620.
4. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, et al. (2002) Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418: 320–323.
5. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, et al. (2004) Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305: 1124.
6. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430: 242–249.
7. WHO (2011) Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC). Geneva: World Health Organization. 88 p.
8. WHO (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010. Geneva: World Health Organization. 116 p.
9. MacPherson DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, et al. (2009) Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerg Infect Dis* 15: 1727–1732.
10. WHO (2010) International Travel and Health. Geneva: World Health Organization. 264 p.
11. Sabatinelli G, Ejov M, Joergensen P (2001) Malaria in the WHO European Region (1971–1999). *Euro Surveill* 6: 61–65.
12. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, et al. (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 344: 257–263.
13. Kublin JG, Dzinjalimala FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, et al. (2002) Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 185: 380–388.
14. Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, et al. (2001) Analysis of pfert point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 114: 95–102.
15. Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O, Durand R (2004) *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment. *J Infect Dis* 189: 195–203.
16. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 710–718.
17. Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J (2006) Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3343–3349.
18. Basco L (2007) Field Application of In Vitro Assays for the Sensitivity of Human Malaria Parasites to Antimalarial Drugs. Geneva: World Health Organization. 202 p.
19. Pradines B, Hovette P, Fusai T, Atanda HL, Baret E, et al. (2006) Prevalence of in vitro resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *J Clin Microbiol* 44: 2404–2408.
20. Le Nagard H, Vincent C, Mentre F, Le Bras J (2011) Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput Methods Programs Biomed* 104: 10–18.
21. Woodrow CJ, Dahlstrom S, Cooksey R, Flegg JA, Le Nagard H, et al. (2013) High-throughput analysis of antimalarial susceptibility data by the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) in vitro analysis and reporting tool. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 3121–3130.
22. Armitage P (1980) *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
23. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, et al. (1997) Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropyrimethamine synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* 176: 1590–1596.
24. Vestergaard LS, Ringwald P (2007) Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J Trop Med Hyg* 77: 153–159.
25. Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, Plowe CV (2008) A network to monitor antimalarial drug resistance: a plan for moving forward. *Trends Parasitol* 24: 43–48.
26. Guerin PJ, Grais RF, Rottingen JA, Valleron AJ (2007) Using European travellers as an early alert to detect emerging pathogens in countries with limited laboratory resources. *BMC Public Health* 7: 8.
27. Wilson ME (2003) The traveller and emerging infections: sentinel, courier, transmitter. *J Appl Microbiol* 94 Suppl: 1S–11S.
28. Gautret P, Cramer JP, Field V, Caumes E, Jensenius M, et al. (2012) Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill* 17.
29. Fogh S, Jepsen S, Effersoe P (1979) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 228–229.
30. Kean BH (1979) Chloroquine-resistant falciparum malaria from Africa. *JAMA* 241: 395.
31. Moran JS (1983) Failure of chloroquine prophylaxis in *Plasmodium falciparum* in Zaire. *Lancet* 2: 171–172.
32. Le Bras J, Decazes JM, Deloron P, Verdier F, Modai J (1984) R-II chloroquine-resistant falciparum malaria from Burundi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 410–411.
33. Le Bras J, Coulaud JP, Bricaire F, Le Bras M, Roue R, et al. (1985) Chloroquine-resistant falciparum malaria in the Congo. *Lancet* 2: 1071.
34. Sansonetti PJ, Lebras C, Verdier F, Charmot G, Dupont B, et al. (1985) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Lancet* 1: 1154–1155.
35. Olsen VV, Jensen T, Jorgensen M (1984) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Angola. *Lancet* 1: 1462–1463.
36. Neequaye J, Coene J, Taelman H, Wéry M, Greenberg AE, et al. (1986) In vivo chloroquine-resistant falciparum malaria in western Africa. *Lancet* 1(0): 2.
37. Le Bras J, Hatin I, Bouree P, Coco-Cianci O, Garin JP, et al. (1986) Chloroquine-resistant falciparum malaria in Benin. *Lancet* 2: 1043–1044.
38. Hellgren U, Ardal OK, Lebbad M, Rombo L (1987) Is chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria emerging in Senegal or The Gambia? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 728.
39. Charmot G, Le Bras J, Doury JC, Baudon D, Roue R, et al. (1988) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Ivory Coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 392–393.
40. Chabasse D, De Gentile L, Ligny C, Le Bras J, Rialland X, et al. (1988) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Mali revealed by congenital malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 547.
41. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, et al. (2002) In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfert and pfmdr1 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 66: 474–480.
42. Sarr O, Myrick A, Daily J, Diop BM, Dieng T, et al. (2005) In vivo and in vitro analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitol Res* 97: 136–140.
43. Bertin G, Ndam NT, Jafari-Guemouri S, Fievet N, Renart E, et al. (2005) High prevalence of *Plasmodium falciparum* pfert K76T mutation in pregnant women taking chloroquine prophylaxis in Senegal. *J Antimicrob Chemother* 55: 788–791.
44. Henry M, Diallo I, Bordes J, Ka S, Pradines B, et al. (2006) Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 75: 146–151.
45. Sarr O, Ahouidi AD, Ly O, Daily JP, Ndiaye D, et al. (2008) Mutations in PFCRT K76T do not correlate with sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine failure in Pikine, Senegal. *Parasitol Res* 103: 765–769.
46. Bob NS, Diop BM, Renaud F, Marrama L, Durand P, et al. (2010) Parasite polymorphism and severe malaria in Dakar (Senegal): a West African urban area. *PLoS One* 5: e9817.
47. Ndiaye D, Patel V, Demas A, LeRoux M, Ndir O, et al. (2010) A non-radioactive DAPI-based high-throughput in vitro assay to assess *Plasmodium falciparum* responsiveness to antimalarials—increased sensitivity of P. falciparum to chloroquine in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 82: 228–230.
48. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, et al. (2012) Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J* 11: 197.
49. Ndiaye M, Faye B, Tine R, Ndiaye JL, Lo A, et al. (2012) Assessment of the Molecular Marker of *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance (Pfert) in Senegal after Several Years of Chloroquine Withdrawal. *Am J Trop Med Hyg* 87: 640–645.
50. Tekete M, Djimde AA, Beavogui AH, Maiga H, Sagara I, et al. (2009) Efficacy of chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of emerging AQ and SP resistance in Mali. *Malar J* 8: 34.
51. Djimde AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, et al. (2008) Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 78: 455–461.
52. Djimde AA, Barger B, Kone A, Beavogui AH, Tekete M, et al. (2010) A molecular map of chloroquine resistance in Mali. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 113–118.
53. Wele M, Djimde AA, Guindo A, Beavogui AH, Traore IZ, et al. (2011) High frequency of PFCRT 76T in two Malian villages and its prevalence in severe relative to non-severe malaria. *Acta Trop* 119: 11–13.
54. Ako BA, Offianan AT, Johansson M, Penali LK, Nguetta SP, et al. (2012) Molecular analysis of markers associated with chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites from southeastern Côte-d'Ivoire by the time of Artemisinin-based Combination Therapy adoption in 2005. *Infect Drug Resist* 5: 113–120.
55. Djaman JA, Ahibo H, Yapi FH, Bla BK, Ouattara L, et al. (2010) Molecular Monitoring of Falciparum Malaria Isolates in Côte d'Ivoire: Genetic Markers (dhfr-ts, dhps, pfert, pfmdr-1) for Antimalarial-Drugs Resistance. *Eur J Sci Research* 40: 10.
56. Ouattara L, Bla KB, Assi SB, Yavo W, Djaman JA (2010) PFCRT and DHFR-TS Sequences for Monitoring Drug Resistance in Adzopé Area of Côte d'Ivoire After the Withdrawal of Chloroquine and Pyrimethamine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 9: 8.
57. Basco LK, Ndounga M, Ngane VF, Soula G (2002) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIV. *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (PFCRT) gene sequences of isolates before and after chloroquine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 67: 392–395.
58. Basco LK (2002) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIII. Analysis of pfert mutations and in vitro chloroquine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 67: 388–391.

59. Mbacham WF, Evehe MS, Netongo PM, Ateh IA, Mimche PN, et al. (2010) Efficacy of amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and their combination for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon at the time of policy change to artemisinin-based combination therapy. *Malar J* 9: 34.
60. Menard S, Morlais I, Tahar R, Sayang C, Mayengue PI, et al. (2012) Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* drug susceptibility at the time of the introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaounde, Cameroon: implications for the future. *Malar J* 11: 113.
61. Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, et al. (2007) Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS One* 2: e139.
62. Ndiaye D, Daily JP, Sarr O, Ndir O, Gaye O, et al. (2005) Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health* 10: 1176–1179.
63. Faye B, Ndiaye M, Ndiaye JL, Annie A, Time RC, et al. (2011) Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during the intermittent preventive treatment in infants coupled with the expanded program immunization in Senegal. *Parasitol Res* 109: 133–138.
64. Doumbo OK, Kayentao K, Djimde A, Cortese JF, Diourte Y, et al. (2000) Rapid selection of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants by pyrimethamine prophylaxis. *J Infect Dis* 182: 993–996.
65. Djimde AA, Dolo A, Ouattara A, Diakite S, Plowe CV, et al. (2004) Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis* 190: 853–855.
66. Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, Traore K, Garba MN, et al. (2005) Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease. *J Infect Dis* 192: 1823–1829.
67. Dicko A, Sagara I, Djimde AA, Toure SO, Traore M, et al. (2010) Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J* 9: 9.
68. Djaman JA, Mazabraud A, Basco L (2007) Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 101: 103–112.
69. Basco LK, Ndounga M, Tejiokem M, Ngane VF, Youmba JC, et al. (2002) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XI. Geographic distribution of *Plasmodium falciparum* isolates with dihydrofolate reductase gene mutations in southern and central Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 67: 378–382.
70. Tahar R, Basco LK (2006) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXII. Geographic mapping and distribution of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (dhfr) mutant alleles. *Am J Trop Med Hyg* 75: 396–401.
71. Mbacham WF, Evehe MSB, Netongo PM, Ali IM, Nfor NE, et al. (2009) Mutations within folate metabolising genes of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *African Journal of Biotechnology* 8: 6.
72. McCollum AM, Basco LK, Tahar R, Udhayakumar V, Escalante AA (2008) Hitchhiking and selective sweeps of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine and pyrimethamine resistance alleles in a population from central Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4089–4097.
73. Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, Guiyedi V, Kombila M, et al. (1999) Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 645–650.
74. Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, et al. (1998) In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother* 42: 333–339.
75. Pradines B, Tall A, Rogier C, Spiegel A, Mosnier J, et al. (2002) In vitro activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 7: 265–270.
76. Pradines B, Tall A, Ramiandrasoa F, Spiegel A, Sokhna C, et al. (2006) In vitro activity of iron-binding compounds against Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Antimicrob Chemother* 57: 1093–1099.
77. Fall B, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, et al. (2011) Ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, to seven standard antimalarial drugs. *Malar J* 10: 310.
78. WHO (2013) Management of severe malaria: A practical handbook. Geneva: World Health Organization. 90 p.



MINISTRE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA
BP V 4 ABIDJAN

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE
ET DE LA RECHERCHE (CNER)
LE PRESIDENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

Abidjan, le 7 janvier 2013

N° 13-2012/MSLS/CNER-P

A
Mr Ako Ako Aristide Berenger
Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Abidjan

Objet : Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé « Dynamique de la résistance aux antipaludiques conventionnels (Chloroquine, Sulfadoxine-pyriméthamine) en Côte d'Ivoire de 2002 à 2009 et diversité génétique des populations de *P. falciparum* »

Monsieur,

Nous accusons réception de votre lettre du 15 décembre 2012 dans laquelle vous nous demandez d'autoriser la mise en œuvre du protocole de recherche de votre thèse.

Le Comité National d'Ethique et de Recherche a examiné votre demande d'autorisation de mise en œuvre du projet de recherche de thèse de doctorat cité en objet en comité restreint le 24 décembre 2012.

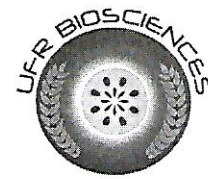
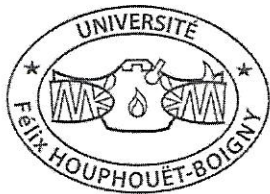
Sous cette perspective, il a émis un avis favorable à l'utilisation de ce protocole. Par conséquent j'en autorise la mise en œuvre dans sa forme soumise au Comité National d'Ethique.

Par ailleurs je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de votre étude.

En vous souhaitant une bonne réception, je vous prie de recevoir, mes meilleures salutations.



Dr Louis Penali



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER DE LA VERSION CORRIGEE DE LA THESE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par Monsieur AKO Ako Aristide Bérenger

THEME : Evolution des résistances à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine, et analyse de la complexité des infections à *Plasmodium falciparum*, Welch (1897) dans quatre localités en Côte d'Ivoire.

Vu et approuvé

Abidjan, 15 avril 2014

Le Doyen de l'UFR Biosciences



Prof. KOUAMELAN Essetchi Paul

Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, 15 avril 2014

Le Vice-Président de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Prof. AFEIAN Kouadio

Professeur Titulaire



RESUME

À Anonkoua-kouté, les fréquences des génotypes de *Plasmodium falciparum* conférant la résistance à la SP et à la CQ ont atteint des niveaux comparables entre isolats d'écoliers asymptomatiques et ceux issus d'enfants symptomatiques en 2008. Les seules différences significatives ont concerné les génotypes AAKAA (35,7 % parmi les enfants asymptomatiques) et SGKAA (32,3 % au sein des participants symptomatiques). A Bonoua et Samo, des niveaux comparables de fréquences ont été aussi déterminés entre individus symptomatiques malgré la différence des faciès épidémiologiques. La diversité allélique a été plus grande dans la localité rurale de Samo avec plusieurs génotypes dont les doubles mutant FAKAS (3,3 %), YAKAS (3,3 %), ou le triple mutant AGKAS (3,3 %). Les isolats issus de Bonoua ont une diversité allélique très réduite avec 4 génotypes du gène *pfdfhr*, trois génotypes pour le gène *pfdhps* dont le mixte SL-GKAA (58,5 %), et le génotype CVIET (100 %) pour le gène *pfprt*. Les fréquences des mutants IRNI, SGKAA et CVIET ont été plus élevées à Anonkoua-kouté et à Ayamé, tandis que le génotype sensible CVMNK a été prédominant à Dabakala. Au cours de la période 2002 à 2008, les prévalences ont augmenté à Anonkoua-kouté (Test de Cochran-Armitage ; $z > 0$) pour les allèles Asn-108 ($p = 0,023$) et Gly-437 ($p = 0,028$). Des tendances contraires ont été mises en évidence (Test de Cochran-Armitage ; $z < 0$) pour les allèles sensibles Ser-108 ($p = 0,017$) et Ala-437 ($p = 0,043$). De même, une baisse significative (Test de Cochran-Armitage ; $z < 0$) de la prévalence du génotype NCSI ($p < 0,0001$) a été aussi mise en évidence. Une augmentation significative (Test de Cochran-Armitage ; $z > 0$) des prévalences du génotype AGKAA ($p = 0,036$; $z > 0$) a été déterminée en même temps que la baisse significative du génotype sensible SAKAA ($p = 0,027$; $z < 0$). Enfin, le nombre minimum de parasites détectés par infection est passé de 3 à 2 clones entre 2002 et 2008 à Anonkoua-kouté.

Mot clés : Dynamique, taux de prévalence, marqueurs moléculaires, résistance, *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine-pyriméthamine, chloroquine, *pfdhps*, *pfdfhr*, *pfprt*, Côte d'Ivoire.

SUMMARY

In Anonkoua-kouté, the frequencies of *Plasmodium falciparum* CQ and SP resistance conferring genotypes reached comparable levels between isolates from asymptomatic schoolchildren and those from symptomatic participants in 2008. However, differences in the proportions of AAKAA (35.7% among asymptomatic children) and SGKAA (32.3% in the symptomatic participants) genotypes were revealed. Likewise, among the symptomatic individuals living in Bonoua and Samo, comparable proportions were also determined despite different epidemiological patterns. Allelic diversity was greater in the rural area of Samo with several genotypes of which the double mutant FAKAS (3.3%), YAKAS (3.3%), or the triple mutant AGKAS (3.3%). In contrast, the allelic diversity of isolates from Bonoua was very limited with 4 genotypes associated with *pfdfhr*, three for *pfdhps* gene of which the mixed genotype SL-GKAA (58.5%) and the only *pfprt* genotype CVIET (100%). Frequencies of IRNI, SGKAA and CVIET were higher in Anonkoua - Kouté (Abidjan) and Ayamé, while the CQ susceptible genotype CVMNK predominated in Dabakala. Within the years 2002 and 2008, various dynamics of alleles were found out in Anonkoua-Kouté. Prevalence increased (Cochran-Armitage test, $z > 0$) for Asn-108 ($p = 0.023$) and Gly-437 ($p = 0.028$) allele. Opposite trends were determined (Cochran-Armitage test, $z < 0$) for the sensitive alleles Ser -108 ($p = 0.017$) and Ala- 437 ($p = 0.043$). Similarly, a significant decrease (Cochran-Armitage test, $z < 0$) of the prevalence of the NCSI ($p < 0.0001$) genotype was also found. A significant increase (Cochran-Armitage test, $z > 0$) of AGKAA ($p = 0.036$, $z > 0$) was detected along with a significant drop in the prevalence of the sensitive SAKAA ($p = 0.027$, $z < 0$). Finally, the minimum number of parasites detected by infection rose from 3 to 2 clones between 2002 and 2008 in Anonkoua-Kouté.

Key words: Dynamics, prevalence, molecular markers, resistance, *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine-pyriméthamine, chloroquine, *pfdhps*, *pfdfhr*, *pfprt*, Côte d'Ivoire.