



HAL
open science

Epidemiologie moléculaire et résistance de *Plasmodium vivax* aux antipaludiques à Madagascar

Celine Barnadas

► **To cite this version:**

Celine Barnadas. Epidemiologie moléculaire et résistance de *Plasmodium vivax* aux antipaludiques à Madagascar. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00330591

HAL Id: tel-00330591

<https://theses.hal.science/tel-00330591>

Submitted on 15 Oct 2008

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.

N° 108-2008

Année 2008

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2008

par

Céline BARNADAS

**Epidémiologie moléculaire et résistance de *Plasmodium vivax*
aux antipaludiques à Madagascar**

Directeur de thèse : Pr Stéphane PICOT

JURY : M. Jean FRENEY
M. Christophe ROGIER
M. Carlo SEVERINI
M^{me} Karine LE ROCH
M. Didier MENARD
M. Stéphane PICOT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean Freney,

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de présider cette soutenance, merci pour votre disponibilité et votre soutien tout au long de ce parcours,

A Messieurs les Docteurs Christophe Rogier et Carlo Severini,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail sur *Plasmodium vivax* et de nous apporter vos critiques et votre expérience, soyez assurés de mon plus profond respect,

A Madame le Docteur Karine Le Roch,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury, et cela en période de vacances...

A Monsieur le Professeur Stéphane Picot,

Je vous remercie de m'avoir permis de parcourir ce chemin dans votre laboratoire, au cours duquel j'ai beaucoup appris. Cette aventure palu va se poursuivre, avec il semblerait une nouvelle escale de l'autre côté de l'atlantique ou dans le pacifique...

A Monsieur le Docteur Didier Ménard,

3 ans (jour pour jour ?) après le début de ce projet vivax lors de ta venue à Lyon, voilà un de ses aboutissements, merci pour ton implication dans ce travail.

Un grand merci

à Christiane Bouchier et Magali Tichit pour votre disponibilité et tout le travail de séquençage que vous avez effectué à l'IPP,
au Dr Arsène Ratsimbasoa et à tous les médecins et techniciens qui ont participé aux missions de terrain aux quatre coins de Madagascar,
au Dr Eric Legrand pour nous avoir permis d'étendre notre travail à des isolats collectés en Guyane,
et au Dr Hervé Bogreau pour m'avoir initiée à la génétique des populations...

Je tiens également à remercier la Fondation Jeunesse Internationale, l'Association des Internes et Anciens Internes en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon et bioMérieux qui m'ont permis par leur soutien financier d'effectuer une partie de ce travail à Madagascar.

A ma famille et amis,

2^{ème} et dernière thèse ! cette fois, c'est fini !? Merci pour votre présence, et vos encouragements ! et puis si vous hésitez encore sur votre prochaine destination de vacances...
Un p'tit mot tout spécialement pour les PS qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse, merci pour cette belle entraide !

Aux belles équipes de recherche sur le palu ... avec qui j'ai pu partager mes journées de labo (et quelques soirées...),

à Lyon, merci pour votre soutien, toutes nos discussions, fous-rires, et tous les moments simples (ou insolites !) que nous avons partagés et qui restent d'inoubliables souvenirs (notamment pour les murs du labo... ?). Quelle sera la prochaine phrase mémorable prononcée ? attention, sans soupir, ou alors, à nos risques et périls... (la préparation du Mojito deviendra-t-elle un gage ?)

et à Madagascar, misaotra betsaka tamin'ireo fotoana tsara rehetra niarahana izay nahafahako nianatra zavatra maro. Izay rehetra vita dia mijanona ho "souvenirs". Manantena ny mbola hifankahita aminareo.

Table des matières

Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	4
Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	6
Données bibliographiques.....	9
I- Le paludisme à <i>Plasmodium vivax</i>	10
I-1- Particularités biologiques de <i>P. vivax</i>	10
I-2- Epidémiologie : importance de l'antigène Duffy	14
I-3- Répartition géographique	16
I-4- Clinique	17
I-5- Diagnostic.....	19
I-6- Les infections mixtes et les interactions entre espèces.....	21
II- Le traitement des infections palustres à <i>P. vivax</i> et la résistance de ce parasite aux antipaludiques	22
II-1- La chloroquine	23
II-2- La primaquine.....	29
II-3- La sulfadoxine - pyriméthamine.....	30
II-4- Les autres antipaludiques disponibles.....	37
III- Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de <i>Plasmodium sp</i> aux antipaludiques.....	39
III-1- Test <i>in vivo</i>	39
III-2- Test <i>in vitro</i>	41
III-3- Recherche de marqueurs moléculaires de résistance.....	43
IV- Le génotypage des souches de <i>P. vivax</i> : apport des gènes <i>csp</i>, <i>msp3a</i>, <i>msp1</i> et des marqueurs microsatellites	45
IV-1- Apport des gènes <i>csp</i> , <i>msp3a</i> , <i>msp1</i>	46
IV-2- Apport des marqueurs microsatellites.....	48
V- Madagascar et le paludisme.....	53
V-1- Données géographiques et historiques.....	53
V-2- Les vecteurs du paludisme.....	54
V-3- Les espèces plasmodiales présentes	55
V-4- Résistance des parasites aux antipaludiques	56
Objectifs.....	58
Résultats.....	60
Partie 1 : Estimation de la prévalence des infections palustres causées par <i>P. vivax</i> , sensibilité de ce parasite à la SP et prévalence des mutations impliquées dans la résistance à cet antipaludique.....	61
Partie 2 : Analyse des microsatellites entourant les gènes <i>dhfr</i> et <i>dhps</i> des isolats de <i>P. vivax</i>	74
Partie 3 : Sensibilité de <i>P. vivax</i> à la CQ et prévalence des mutations impliquées dans la résistance à cet antipaludique.	88
Partie 4 : Diversité génétique et structure des populations parasitaires de <i>P. vivax</i> à Madagascar.	119
Discussion.....	130

Annexes.....	134
Annexe 1 : Planche pour le diagnostic microscopique de <i>P. vivax</i>	135
Annexe 2 : Comparaison de trois méthodes pour le diagnostic du paludisme en zone d'endémie.....	136
Annexe 3 : Polymorphisme des antigènes détectés par les tests rapides pour le diagnostic du paludisme.....	141
Annexe 4 : Prévalence et sensibilité de <i>Plasmodium malariae</i> à Madagascar.....	143
Annexe 5 : Description des sites sentinelles inclus dans le test d'efficacité thérapeutique.....	147
Annexe 6 : Programmes d'amplification et interprétation des résultats,.....	150
thermocycleur pour PCR temps réel RotorGene.....	150
Annexe 7 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvdhfr</i>	152
Annexe 8 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvdhps</i>	153
Annexe 9 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvcrt-o</i>	154
Annexe 10 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvm-dr1</i>	155
Annexe 11 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvcsp</i>	156
Annexe 12 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvm-sp3a</i>	157
Annexe 13 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène <i>pvm-sp1</i>	158
Références bibliographiques.....	159

Liste des figures

Figure 1. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium</i> sp.....	10
Figure 2. Représentation de la distribution géographique des espèces plasmodiales <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> en 2005.....	16
Figure 3. Mécanismes proposés pour la chloroquino-résistance ; Implication des protéines PfCRT et Pgh1.....	25
Figure 4. Répartition des génotypes sauvage à quintuple muté identifiés sur le gène <i>pvdhfr</i> dans les principales zones de transmission de <i>P. vivax</i>	35
Figure 5. Clairance parasitaire de <i>P. vivax</i> après traitement par différentes molécules antipaludiques ou antibiotiques.	37
Figure 6. Hétérozygotie moyenne attendue des marqueurs microsatellites en fonction de leur distance au gène <i>pfdhfr</i>	51
Figure 7. Réduction de la diversité génétique sur les souches mutées sur le gène <i>dhfr</i>	52
Figure 8. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1. Polymorphismes identifiés sur le gène <i>pvmdr1</i>	26
Tableau 2. Polymorphisme du gène <i>pvcrt-o</i> et réponse <i>in vivo</i> à la chloroquine des souches de <i>P. vivax</i>	28
Tableau 3. Génotypes identifiés sur le gène <i>dhfr</i> dans les différentes zones de transmission de <i>P. vivax</i>	33
Tableau 4. Avantages et inconvénients des différents indicateurs disponibles pour surveiller la résistance des souches plasmodiales aux antipaludiques.	45
Tableau 5. Prévalence des espèces plasmodiales sur 4 sites de Madagascar.....	55
Tableau 6. Prévalence des espèces plasmodiales sur 3 régions de Madagascar.....	56

Liste des abréviations

ACT: Artemisinin Combined Therapy
AMA1: Apical Membran Antigen 1
CQ : Chloroquine
CRT : Chloroquine Resistance Transporter
CSP : CircumSporozoite Protein
DARC: Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DBL ou DBP: Duffy-binding like domain ou Duffy binding protein
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHFR : Dihydrofolate reductase
DHPS : Dihydropteroate synthase
EBP : Erythrocyte Binding protein
EPO: Erythropoïétine
HRP2 : Histidine rich protein 2
IL-3: Interleukine 3
LDH : Lactate déshydrogénase
MDR : Multi Drug Resistance
MSP : Merozoite Surface Protein
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PvRBP : *P. vivax* reticulocyte binding protein
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SCF : Stem cell factor
SNP : single nucleotide polymorphism
SP : Sulfadoxine Pyrimethamine
T_m : Température de melting (température de fusion)
TNF : Tumor necrosis factor
TPI : Traitement Préventif Intermittent

Introduction

Malgré les différents projets mis en place depuis plus de 50 ans pour éradiquer le paludisme, et ensuite plus modestement pour le contrôler, cette maladie affecte encore de nos jours plus de 40% de la population mondiale [1]. Elle est responsable chaque année de plus de 500 millions d'accès cliniques entraînant près de 3 millions de décès dont 90% d'entre eux surviennent en Afrique subsaharienne [2, 3].

La distribution géographique du paludisme évolue encore puisque des zones considérées comme indemnes sont redevenues endémiques. La disparition du paludisme des régions tempérées, au début du XX^{ème} siècle, a ramené son aire de distribution à la ceinture tropicale et subtropicale. De 1950 à 1970, les opérations d'éradication ont provoqué une nouvelle réduction territoriale de la maladie et, surtout, ont mis en relief la variabilité régionale de l'endémicité. Si la région afro-tropicale est actuellement considérée comme « le continent du paludisme » en concentrant plus de 90% des cas [4] (OMS, 1993), il n'en demeure pas moins que la quasi-totalité du continent asiatique avec des niveaux de transmission variables est également touché. En Europe, depuis la fin de la seconde guerre mondiale, le paludisme n'existe quasiment plus. Des cas isolés peuvent survenir comme, en 2006, un cas de paludisme causé par *P. vivax* en Corse [5] mais la majorité est due au paludisme d'importation [6].

Aujourd'hui, la diffusion des souches plasmodiales résistantes aux antipaludiques dans de nombreuses régions du globe reste un des facteurs principaux aggravant cette affection en menaçant les différents efforts de lutte déployés. Si l'émergence et la diffusion de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine (CQ) à partir de foyers situés soit en Asie du sud-est, soit en Amérique du sud est bien connue depuis plus de 20 ans, l'émergence de la résistance de *P. vivax* ou *P. malariae* est plus récente. D'abord décrite pour la chloroquine, cette résistance existe également vis-à-vis d'autres antipaludiques comme la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), la méfloquine, l'atovaquone-proguanil [7].

Actuellement, selon les dernières estimations, *P. vivax* pourrait être responsable de 70 à 80 millions de cas par an [8], voire de 130 à 435 millions [1]. Il s'agit de l'espèce plasmodiale la plus répandue même si sa place en Afrique sub-saharienne est minoritaire, la grande majorité des cas étant imputable à *P. falciparum*. Dans un contexte de changement des politiques nationales de traitement dans les pays où le paludisme est endémique, on mesure mal les conséquences que peut avoir la diminution de la prévalence de *P. falciparum* sur les autres espèces plasmodiales infectant l'homme, les interactions entre les espèces parasitaires étant complexes et mal connues. Les estimations concernant l'importance de ce parasite varient selon la méthodologie utilisée, mais une chose est sûre, la prévalence et l'importance

de ce parasite ont été largement sous-estimées. A titre d'exemple, on sait que même dans les zones de faible transmission, 20% des patients présentent une infection symptomatique chaque année, soit 10 à 30 épisodes durant leur vie [8]. Même si le coût économique de la morbidité liée à *P. vivax* ne peut être estimé que très approximativement, si l'on prend en compte le coût d'un traitement antipaludique, l'absentéisme scolaire, la perte de productivité, son estimation varie entre 1,4 et 4 milliards de dollars par an [9].

Entre 1966 et 2002, 435 études visant à déterminer l'efficacité thérapeutique *in vivo* de médicaments antipaludiques ont été publiées, 87% d'entre elles concernaient *P. falciparum* [10]. Pendant la même période, moins d'une dizaine concernaient *P. malariae* et 47 seulement *P. vivax*. Même si la mortalité imputée aux infections par *P. vivax* reste faible, la morbidité due à ce parasite est proche de celle de *P. falciparum* dans les zones où les deux espèces coexistent.

La présente étude, réalisée dans le cadre d'une collaboration entre le Service de Parasitologie - Mycologie Médicale du Pr Stéphane Picot (Université C. Bernard, Lyon 1) et l'Unité de Recherche sur le Paludisme du Dr Didier Ménard (Institut Pasteur de Madagascar) avait pour objectifs d'évaluer :

- la prévalence des infections palustres à *P. vivax* sur le territoire malgache,
- la sensibilité de ce parasite aux antipaludiques, notamment à la sulfadoxine-pyriméthamine, et à la chloroquine,
- la fiabilité de marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la résistance sur différents sites de Madagascar,
- d'appréhender la structure des populations parasitaires de *P. vivax* à Madagascar.

Nous présenterons ainsi dans un premier temps, quelques rappels sur les particularités biologiques, cliniques et épidémiologiques du paludisme du à *P. vivax*, sur les traitements recommandés et sur les mécanismes de résistance du parasite aux antipaludiques couramment utilisés. Nous verrons ensuite les moyens actuellement disponibles pour mettre en place la surveillance de l'évolution de la chimiorésistance, et les données existantes sur la situation du paludisme à *P. vivax* à Madagascar au moment de notre étude. Nous développerons dans un deuxième temps, la partie expérimentale de notre travail avec la présentation de nos résultats sur l'efficacité thérapeutique de la chloroquine et de la sulfadoxine-pyriméthamine et l'intérêt des marqueurs moléculaires.

Données bibliographiques

I- Le paludisme à *Plasmodium vivax*

P. vivax est actuellement l'espèce la plus répandue dans le monde et occupe la deuxième place en terme de morbidité palustre derrière *P. falciparum*. Comme nous allons le voir, plusieurs caractéristiques biologiques propres à ce parasite expliquent en partie son importance.

I-1- Particularités biologiques de *P. vivax*

Le cycle parasitaire de *Plasmodium* est dixène, composé d'une réplication sexuée chez le vecteur, un moustique femelle du genre anophèle, et d'une réplication asexuée chez son hôte, l'homme (Figure 1). Cette réplication asexuée comporte deux phases : la première, hépatique, et la seconde, érythrocytaire. C'est au niveau sanguin que vont apparaître les gamétocytes transmissibles à l'anophèle, permettant la poursuite du cycle parasitaire et la transmission ultérieure à d'autres humains. Les particularités du cycle de *P. vivax* vont se révéler au niveau de chacun de ses deux hôtes.

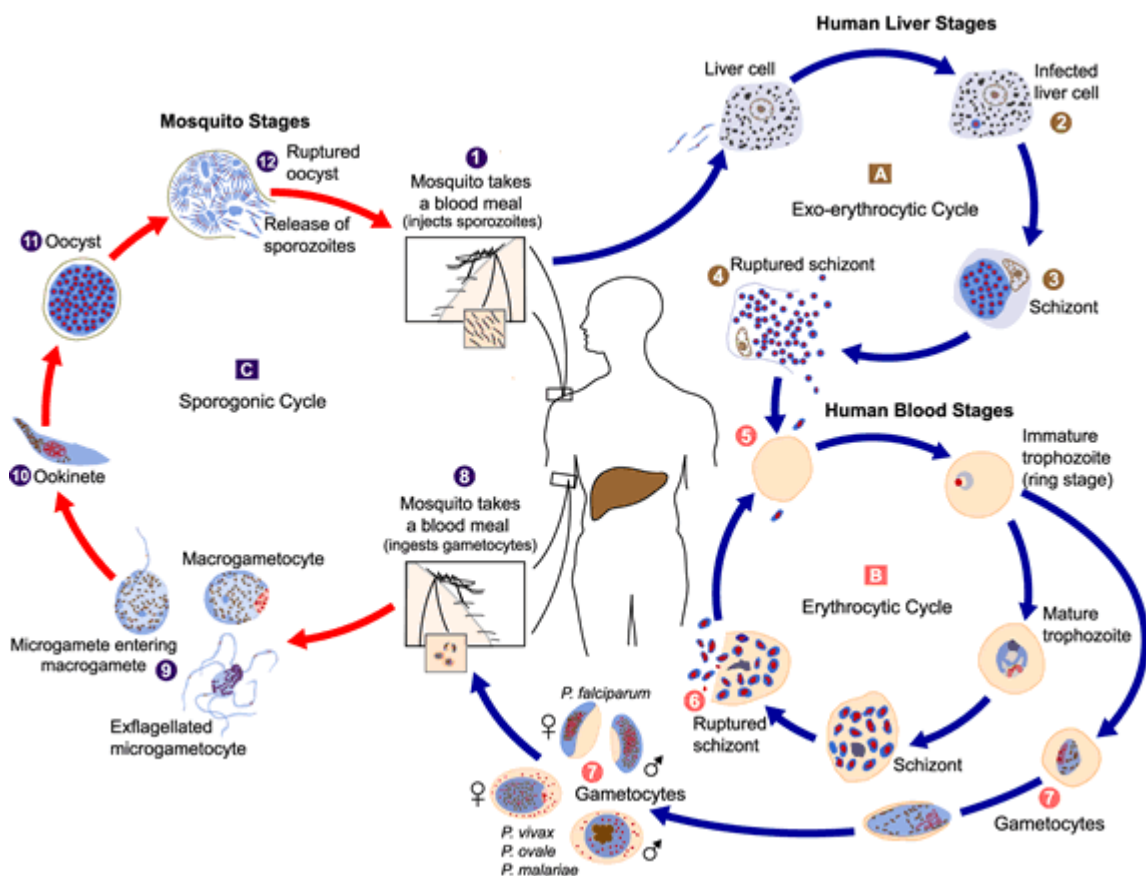


Figure 1. Cycle parasitaire de *Plasmodium* sp.

(d'après http://www.uni-tuebingen.de/modeling/Mod_Malaria_Cycle_en.html)

I-1-a-Le cycle anophélien

Après un repas sanguin, seules les formes gamétocytes femelles et mâles absorbées vont se développer chez l'anophèle femelle, se transformant respectivement en gamètes femelles et par exflagellation et division du noyau en gamètes mâles. Les éléments asexués seront digérés dans l'estomac du moustique. Après fécondation des gamètes et formation d'un zygote, l'ookinète va traverser la paroi stomacale du moustique et devenir un oocyste qui se divise immédiatement. C'est au niveau de la conjugaison des gamètes mâles et femelles et de la première méiose que la recombinaison des génotypes est possible. Les cellules dans l'oocyste vont prendre une forme allongée, se transformant en sporoblastes puis en sporozoïtes. La paroi de l'oocyste va alors se déchirer et les sporozoïtes libérés vont terminer leur maturation avant de gagner les glandes salivaires.

A 25°C, ce cycle a une durée moyenne de 11 jours pour *P. vivax*, durée inférieure à celle du cycle sexué de *P. falciparum* (13 jours). La durée du cycle est un élément capital pour la transmissibilité de l'espèce parasitaire, avec des répercussions sur la répartition géographique des espèces plasmodiales. *P. vivax* peut être transmis dans les régions tempérées durant les courtes périodes chaudes alors que les autres espèces sont limitées aux régions subtropicales et tropicales. Le cycle sporogonique de *P. vivax* peut de plus se dérouler à des températures extérieures inférieures de 3°C en moyenne à celles de *P. falciparum* (15°C versus 18°C).

I-1-b-Le cycle hépatique et les hypnozoïtes

Le cycle intra-hépatique de *P. vivax* a en moyenne une durée plus longue que celle de *P. falciparum* (12 jours versus 7 jours). *P. vivax* a de plus la capacité de former, lors de la première phase hépatique de l'infection palustre, des formes quiescentes appelées hypnozoïtes.

Ces hypnozoïtes vont rester à l'état latent au niveau hépatique pendant une durée propre au type de souche et dépendant de son environnement. Ces formes vont être à l'origine d'accès de reviviscence, et donc de paludisme clinique, selon une périodicité qui est déterminée notamment en fonction de l'origine géographique des souches. En zone tempérée, ces accès vont se produire en général tous les 5 à 10 mois permettant au parasite de réapparaître au niveau sanguin pendant la saison de transmission, tandis qu'en zone tropicale, ils seront beaucoup plus rapprochés (3 à 5 semaines). Des clones peuvent néanmoins avoir des profils de reviviscence mixtes, produisant des accès à intervalles irréguliers [11, 12].

La reviviscence de ces formes hypnozoïtes induit des difficultés pour l'interprétation des résultats des tests d'efficacité thérapeutique *in vivo*. En effet, dans le cas de *P. vivax*, la réapparition d'une parasitémie chez un patient après un traitement antipaludique peut avoir trois origines : soit il s'agit des parasites responsables de l'accès primaire, soit il s'agit d'un accès de reviviscence du aux formes hypnozoïtes quiescentes, soit il s'agit d'une nouvelle infection provoquée par une nouvelle piqûre d'un anophèle infecté. Chen et al, 2007 [11] ont montré après séquençage de fragments des gènes *msp1* (*merozoite surface protein 1*), *ama1* (*apical membran antigen 1*) et *csp* (*circumsporozoite surface protein*) une grande diversité génétique chez les clones responsables de reviviscences : sur les isolats collectés chez 86 patients (soldats australiens postés au Timor Oriental) ayant subi un nouvel accès, 78 génotypes parasitaires différents ont été identifiés. Sur 15 patients pour lesquels les isolats ont pu être collectés lors de deux accès successifs (après leur retour de la zone d'endémie), 10 sur 14 (71%) étaient constitués de génotypes différents. L'activation des hypnozoïtes semble donc clonale.

Les mécanismes conduisant à l'activation des hypnozoïtes sont encore inconnus. L'hypothèse d'une induction par les piqûres d'anophèles non infectés a récemment été proposée [13]. Les auteurs de cette étude rétrospective menée en Finlande (1750-1850) ont en effet observé une corrélation importante entre les températures des mois chauds (juin-juillet) favorisant un développement des larves de moustique et une augmentation de la mortalité en août et septembre imputable au paludisme. Dans les conditions climatiques de ce pays, le cycle sporogonique de *P. vivax* étant long, ces cas de paludisme ne peuvent pas correspondre à une infection primaire mais pourraient résulter de la réactivation d'hypnozoïtes quiescents par un signal transmis lors des piqûres par des anophèles non infectés.

Cette hypothèse ne prend cependant pas en compte une spécificité des mécanismes de réactivation, aboutissant à l'activation d'un clone. Contrairement à une étude antérieure [14], dans une étude multicentrique (impliquant des patients de Thaïlande, du Myanmar et d'Inde) publiée en 2007, Imwong et al [12] ont montré que les isolats provoquant les accès de reviviscence étaient différents de celui responsable de l'accès primaire, ceci en l'absence de ré-infestation et après traitement de l'accès primaire par un traitement efficace. Deux hypothèses ont été émises : d'une part, lors de la piqûre infestante par un anophèle, celui-ci inocule plusieurs clones parasitaires qui auront un devenir différent (cause d'un accès primaire et/ou formation d'hypnozoïtes) ; d'autre part, la réactivation des hypnozoïtes présents dans l'organisme depuis une infection plus ancienne est la conséquence d'une nouvelle infection conduisant par un mécanisme non élucidé à réactiver ces formes

quiescentes. Enfin, il pourrait s'agir d'infections initialement polyclonales, ayant engendré le développement d'une immunité dirigée contre le clone majoritaire lors de l'accès primaire, le système immunitaire étant alors capable de réagir à nouveau lors d'une réactivation d'hypnozoïtes provenant du même clone et laissant donc place à des accès de reviviscences causé par des clones initialement minoritaires.

I-1-c-Le cycle érythrocytaire et les formes asexuées

Au contraire de *P. malariae* infectant les érythrocytes âgés, *P. vivax* n'envahit que les jeunes hématies exprimant à leur surface l'antigène Duffy. Deux protéines se liant à des récepteurs à la surface des réticulocytes ont été identifiées : il s'agit de PvRBP-1 et PvRBP-2 (*P. vivax* reticulocyte binding protein) [15]. Ces protéines sont localisées au niveau du complexe apical des mérozoïtes et pourraient être responsables de la reconnaissance parasite-réticulocytes. Les réticulocytes ne représentant que 1% environ des érythrocytes totaux, cela constitue un facteur limitant important pour la croissance *in vivo* de *P. vivax* et également pour la mise au point de tests pour la surveillance de la chimiorésistance de ce parasite *in vitro*. Il en résulte que les parasitémies observées pour *P. vivax* sont généralement plus basses que pour *P. falciparum*. Cependant, une étude menée en Thaïlande, dans une région de faible endémicité, a montré que le seuil pyrogénique d'une parasitémie à *P. vivax* était plus bas qu'à *P. falciparum* (180 parasites/ μ L versus 1000 pour *P. falciparum*) [16] ; cela est conforté par des taux plus élevés de TNF- α , cytokine pro-inflammatoire participant à l'induction de la fièvre, dans le cas des infections à *P. vivax* (cela même dans le cas de parasitémies égales à *P. falciparum*) [17-19].

Le cycle de *P. vivax* dure entre 42 et 48 heures. A chaque cycle, le nombre de mérozoïtes libérés est habituellement de 8 à 16. Lors de la réalisation de frottis sanguins, tous les stades parasitaires peuvent être présents alors que pour *P. falciparum* les stades âgés ne sont généralement pas visibles. On observe dans les hématies parasitées par *P. vivax* une déformabilité augmentée au fur et à mesure de la maturation des parasites ; les hématies parasitées par *P. vivax* ne seraient pas séquestrées au niveau des différents organes ou dans la microcirculation [20]. Cependant les cas de paludisme sévères à *P. vivax* de plus en plus décrits remettent en cause cette hypothèse.

I-1-d-Le cycle érythrocytaire et les formes sexuées

Enfin, le dernier caractère que nous tenions à évoquer concerne la capacité de *P. vivax* à former des formes gamétocytes de façon précoce. La gamétocytogénèse de *P. vivax* peut

débuter dès la première génération de mérozoïtes, en l'absence de signes cliniques (et donc avant l'instauration d'un traitement), ce qui confère au parasite une transmissibilité augmentée par rapport aux autres espèces [21].

P. vivax est donc capable de se transmettre sous des conditions climatiques plus difficiles que *P. falciparum*, a la capacité de s'adapter à l'épidémiologie de son terrain, et peut se transmettre plus facilement.

I-2- Epidémiologie : importance de l'antigène Duffy

Il est admis que, en dehors de quelques foyers, *P. vivax* est absent d'Afrique subsaharienne conséquence d'un polymorphisme génétique des populations humaines. Dans les années 70, l'implication de l'antigène Duffy a été découverte. Les quelques foyers où les cas de paludisme à *P. vivax* persistent seraient liés à la présence de populations humaines qui présentent le récepteur pour l'antigène Duffy à la surface de leurs hématies.

L'infection des hématies par *P. vivax* nécessite donc à leur surface la présence d'un récepteur appelé « Duffy Antigen Receptor for Chemokines » ou DARC.

L'antigène Duffy est une protéine de 38 kDa comportant 7 domaines transmembranaires et possédant 66 acides aminés extracellulaires à son extrémité N-terminale. 35 acides aminés à cette extrémité N-terminale de la protéine jouent le rôle de récepteur pour l'invasion du parasite dans l'érythrocyte [22]. L'antigène Duffy est codé par deux allèles co-dominants FYA et/ou FYB. La présence d'une mutation en position -33 sur le promoteur du gène va entraîner la non-expression de l'allèle et l'absence de la protéine à la surface de l'érythrocyte [23]. Le gène n'est en effet plus reconnu par le facteur de transcription GATA-1. Le type d'allèle (FYA ou FYB) est déterminé par la présence d'une mutation sur le codon 42 (présence d'une glycine pour FYA ou d'un résidu acide aspartique pour FYB) [24].

Les protéines parasitaires qui se lient aux récepteurs érythrocytaires durant le processus d'invasion appartiennent à la famille des EBP, Erythrocyte Binding Protein. Chacune de ces protéines est caractérisée par un domaine extracellulaire qui contient deux régions conservées riches en cystéine et en acides aminés hydrophobes, les régions II et IV.

Seules deux espèces plasmodiales, *P. vivax* et *P. knowlesi* possèdent le ligand du récepteur DARC, un domaine nommé « Duffy-binding like domain » (DBL) ou « Duffy

binding protein » (DBP). Plus précisément, c'est la région II de PvDBP qui se lie au récepteur DARC. Les EBP sont localisées dans les micronèmes et leur présence à la surface des mérozoïtes n'a pas été mise en évidence. Il est possible que l'interaction entre les protéines PvRBP-1 et PvRBP-2 (*P. vivax* reticulocyte binding protein) et leurs récepteurs à la surface des réticulocytes déclenche l'entrée en scène de PvDBP. Après interaction entre un mérozoïte et un érythrocyte, le mérozoïte va se ré-orienter de façon à présenter son complexe apical face à l'érythrocyte. Les micronèmes et rhoptries vont déverser leur contenu provoquant une jonction irréversible entre le complexe apical du mérozoïte et l'érythrocyte cible. Cela va former une enveloppe autour du mérozoïte qui se retrouve alors dans une vacuole à l'intérieur de l'hématie [25]. Des anticorps dirigés contre PvDBP bloquent l'invasion des réticulocytes. DBP est un candidat vaccinal mais son polymorphisme important rend difficile la mise au point d'un vaccin [26].

Des études ont porté sur la susceptibilité des individus face au paludisme causé par *P. vivax* en fonction de leur génotype Duffy. Une différence du niveau d'expression de l'antigène à la surface des érythrocytes a été montrée entre les individus de génotype FYA/FYA^{null} et les patients homozygotes FYA/FYA [27]. Une réduction de la parasitémie moyenne des infections à *P. vivax* chez les individus hétérozygotes FYA/FYA^{null} a été observée dans une étude menée en Papouasie Nouvelle Guinée, cela dans un groupe d'enfants de moins de 5 ans en l'absence d'immunité acquise [28]. Le niveau de la parasitémie était comparable, dans cette population, aux parasitémies observées chez les sujets plus âgés, immuns. Le statut hétérozygote des sujets FYA/FYA^{null} pourrait leur apporter une protection vis-à-vis de l'infection par *P. vivax*, par une diminution du nombre de récepteurs érythrocytaires pour le parasite.

Récemment, la présence d'un parasite identifié en microscopie comme *P. vivax* a été rapportée dans une population du Kenya n'exprimant pas la protéine Duffy [29]. Des études entomologiques ont montré dans cette même région (par ELISA) la présence de sporozoïtes de *P. vivax* chez deux espèces d'anophèles, *An. gambiae* et *An. funestus* à la fin de la saison des pluies. Si cela était confirmé, cela signifierait que *P. vivax* est capable d'envahir les érythrocytes via d'autres récepteurs que l'antigène Duffy et qu'il posséderait donc d'autres ligands. Le domaine se liant à Duffy a été le premier identifié de la famille des EBP. *P. knowlesi* possède par exemple deux autres gènes codant pour des protéines ligand (provenant initialement d'une duplication du gène, et ayant évolué différemment sur des chromosomes différents). *P. knowlesi* peut envahir les hématies via un autre récepteur érythrocytaire, et l'on

peut penser que *P. vivax* ait évolué de manière similaire, ne se contentant pas d'une seule stratégie pour envahir les hématis [30].

I-3- Répartition géographique

Ce sont 2,5 à 2,6 milliards de personnes qui vivent dans des zones à risque de paludisme sur notre planète et selon les estimations *P. vivax* pourrait être responsable de 70 à 80 millions [8], voire de 130 à 435 millions de cas par an [1].

De manière générale, *P. vivax* est très largement répandu sur tous les continents excepté en Afrique tropicale (*Figure 2*) où *P. falciparum* prédomine, malgré la présence de *P. malariae* qui peut parfois causer jusqu'à un tiers des cas de paludisme, et celle de *P. ovale* néanmoins plus rare [8]. En outre, il est classique d'observer que la prévalence de *P. vivax* augmente dans les zones de conflits armés en raison des déplacements de populations et des conséquences économiques et sociales de la guerre [31].

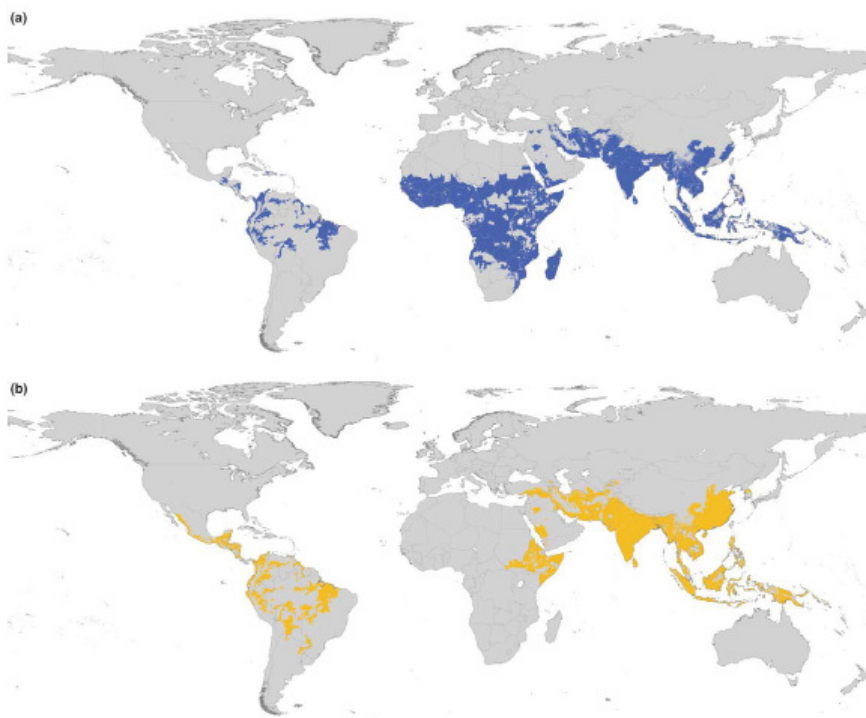


Figure 2. Représentation de la distribution géographique des espèces plasmodiales *P. falciparum* et *P. vivax* en 2005.

(a) *P. falciparum* ; (b) *P. vivax*
D'après Guerra et al, 2005 [32]

Sur la ceinture tropicale de l'Afrique, l'incidence de *P. vivax* reste faible [33]. En revanche, dans les territoires d'Afrique de l'est et du sud, ainsi qu'à Madagascar, *P. vivax* pourrait représenter jusqu'à 20% des cas de paludisme. Au Soudan, 5 à 10% des infections palustres sont dues à *P. vivax*, et en Ethiopie, il est responsable de 20% à 40% des infections palustres dans certaines régions du pays [34]. Il est en fait présent dans les populations afro-asiatiques notamment au Kenya, en Tanzanie ainsi que dans les îles de l'océan indien.

La majorité des infections à *P. vivax* se situe hors d'Afrique, plus particulièrement en Asie du sud est et dans le pacifique où *P. vivax* représente 49% des cas de paludisme. La prévalence relative de cette espèce augmente en Amérique du sud et Amérique centrale, avec de 71% à 81% des cas de paludisme. On le retrouve notamment au Pérou, en Bolivie et en Guyane Française [35-38]. Ce sont également 81% des cas de paludisme qui sont imputables à *P. vivax* dans les régions méditerranéennes de l'est, et 100% des les pays de l'ex URSS.

Le ratio entre les infections palustres dues à *P. vivax* ou *P. falciparum* varie ainsi largement selon les zones géographiques. Il est le plus bas en Afrique tropicale (0-20% des infections palustres), et augmente dans les zones de transmission moins intenses comme en Asie du sud, dans le Pacifique ouest et en Amérique du sud. Ainsi *P. vivax* semble être le parasite des situations plus difficiles et concède sa place à *P. falciparum* lorsque les conditions climatiques s'améliorent pour celui-ci. En outre, depuis 1993, la Corée du sud a vu réapparaître ce parasite alors que le paludisme avait disparu officiellement depuis 1979 [39, 40]. 4142 cas étaient décrits en l'an 2000. Cette ré-émergence pourrait provenir de moustiques infectés originaires de la Corée du Nord, dans la zone de démilitarisation où la maladie aurait persisté sans être détectée, ou de sources extérieures (Corée du Nord, Chine ou Asie de l'est) [41, 42].

En France, de 2001 à 2004, 6500 à 7000 cas de paludisme d'importation étaient déclarés chaque année. Les proportions des espèces étaient de 83,5% de *P. falciparum*, 6,5% de *P. ovale*, 4,5% de *P. vivax* et enfin 1,6% de *P. malariae* [43].

I-4- Clinique

Le paludisme à *P. vivax* induit classiquement un paroxysme avec une récurrence de 48 heures coïncidant avec l'éclatement des schizontes. La durée des accès palustres est habituellement inférieure à 8 heures, avec une fièvre brutale pouvant aller jusqu'à 41°C et qui va diminuer progressivement passé des étapes de frissons, sueurs. Ces symptômes peuvent

être accompagnés de maux de tête, de nausées, de vomissements, de douleurs musculaires. Ils ne sont pas spécifiques de l'infection par *P. vivax*. Le patient après une crise de paludisme à *P. vivax* est dans un état d'épuisement intense [44].

Il a longtemps été considéré que le paludisme causé par *P. vivax* était bénin mais les symptômes peuvent parfois être graves et lourds de conséquences. Classiquement, il est décrit chez les patients une fièvre importante, des frissons, nausées, vomissement. Les pics de fièvre sont accompagnés de hauts taux de TNF (tumor necrosis factor) dont la sécrétion par les macrophages est induite par le relargage lors de l'éclatement des schizontes parasites de glycosylphosphatidylinositol [45].

Les rares cas entraînant la mort peuvent survenir après une rupture splénique. Cette rupture de la rate est causée par une altération de sa structure, résultat d'une activation lymphatique des tissus et d'une stase dans les sinus spléniques causée par les érythrocytes parasités dont la surface est déformée. Cela peut aussi donner lieu à des complications moins graves : hématomes, torsions, hypersplénisme [46].

On pensait également que les cas de neuropaludisme ne pouvaient être dus à une infection par *P. vivax* seul mais résultaient d'une co-infection avec *P. falciparum*. Cependant avec les apports de la biologie moléculaire et le diagnostic d'espèce rendu possible par PCR, plusieurs patients souffrant de neuropaludisme, de syndrome de détresse respiratoire aigue ou de dysfonctionnement hépatique ou insuffisance rénale n'étaient infectés que par *P. vivax*. Au contraire de *P. falciparum*, les hématies parasitées par *P. vivax* ne sont pas séquestrées dans la microcirculation cérébrale.

Comme décrit dans la revue de K. Baird [47], nous avons recensé dans la littérature entre 1998 et 2007, 28 cas d'insuffisance rénale, 15 cas de syndrome de détresse respiratoire aigue, 8 cas de neuropaludisme, 2 cas de rupture de la rate et 8 cas de dysfonctionnement hépatique. A cela s'ajoutent les problèmes d'anémie, de thrombocytopenie... Malgré tout, seuls 45 cas de neuropaludisme ont été publiés dans la littérature anglophone depuis les années 1920.

L'anémie est un facteur de morbidité important dans les infections à *P. vivax* ; les anémies sont fréquentes et surtout sévères [48, 49]. Des cas de thrombopénie ont été rapportés, avec parfois des thrombopénies très sévères comme 8.10^9 plaquettes /L et 5.10^9 en l'absence de saignements [50-53]. Les mécanismes conduisant à ces thrombopénies ne sont pas clairement définis ; le M-CSF (macrophage stimulating factor) interviendrait en stimulant l'activité des macrophages, médiant dans certains cas une destruction des plaquettes. Le stress oxydatif pourrait aussi intervenir ainsi que la formation de complexes immuns.

Les cas d'atteintes pulmonaires sont probablement sous-estimés, et seraient liés au déclenchement d'une réaction inflammatoire. Ces atteintes pulmonaires peuvent être de types œdémateuses et peuvent entraîner un syndrome de détresse respiratoire. Elles sont de mauvais pronostic. Cependant leur fréquence est plus faible dans les cas de paludisme dus à *P. vivax* (par rapport à *P. falciparum*), probablement en l'absence de séquestration des hématies parasitées dans la microcirculation, et avec un relargage de toxines plasmodiales plus faible dans le cas de *P. vivax*. La réponse inflammatoire induite, avec ses effets délétères, serait plus faible. L'hypoalbuminémie résultant d'un état de malnutrition pourrait aggraver les œdèmes pulmonaires.

Les mécanismes conduisant à ce type d'atteintes passeraient par une accumulation des cellules monocytaires, conduisant à une inflammation et à une altération des fonctions pulmonaires : diminution des échanges gazeux, augmentation de l'activité des cellules phagocytaires, manifestations respiratoires. L'acidose métabolique semble être, chez les enfants, une des causes majeures de cette détresse respiratoire. Elles surviennent parfois après plusieurs jours de traitement, suggérant que ces manifestations peuvent être la conséquence de la lyse des parasites par les antipaludiques, provoquant une réponse inflammatoire, conduisant à des atteintes pulmonaires [54-57]. Il est possible que l'effet anti-inflammatoire de la chloroquine, molécule la plus utilisée dans le traitement des cas de paludisme à *P. vivax*, ait atténué la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire chez les patients infectés [58].

I-5- Diagnostic

Comme pour toutes les espèces plasmodiales, le diagnostic biologique d'une infection à *P. vivax* peut être réalisé sur frottis sanguin ou goutte épaisse, avec coloration au May-Grünwald-Giemsa. Une planche exposant les différents stades parasitaires est présentée en annexe 1. Le frottis sanguin est considéré comme la technique de référence, et sa sensibilité estimée à 200 hématies parasitées par μL de sang. La goutte épaisse rend le diagnostic d'espèce plus difficile à réaliser, mais permet d'augmenter la sensibilité du diagnostic à 10 à 20 hématies parasitées par μL de sang [59]. La microscopie nécessite toutefois la présence d'un microscopiste expérimenté ; les mouvements de populations humaines du 20^{ème} siècle ne permettent plus un diagnostic porté sur un critère géographique des espèces plasmodiales mais sur leurs critères morphologiques propres. De plus, des données relativement récentes soulignent les limites de la microscopie pour l'identification des espèces parasitaires. *P. vivax*

est morphologiquement proche de *P. ovale*. Des cas récents d'infections humaines par *P. knowlesi* ont également été décrits (parasites d'origine simienne). Cette espèce est très proche morphologiquement de *P. malariae*, mais les contacts de plus en plus étroits entre les populations humaines et de nouveaux biotopes renforcent la possibilité de passages inter-espèces des parasites notamment du singe à l'homme.

Des tests de détection antigéniques rapides ont été développés avec une visée diagnostique essentiellement tournée vers *P. falciparum*. Ces tests permettent la détection d'antigènes palustres après migration de sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose et réaction avec des anticorps préalablement fixés. Différents anticorps sont utilisés, spécifiques du genre *Plasmodium* (anti-aldolase, anti-pLDH), c'est-à-dire présentant des réactivités croisées entre les quatre espèces, ou spécifique d'espèce (anti-HRP2, anti-LDH). Dans ce dernier cas, les troussees commerciales disponibles proposent des réactions spécifiques pour *P. falciparum* et *P. vivax*. La sensibilité de ces tests est identique à celle d'un frottis sanguin pour les parasitémies $\geq 1\%$, mais une variabilité importante existe selon les espèces parasitaires présentes. Selon Ratsimbasoa et al, 2007 [60], la sensibilité d'un test rapide (basé sur la détection de la LDH parasitaire) était estimée entre 88.9% et 100% pour des parasitémies comprises entre 500 et 5000 parasites/ μ L et 50% pour des parasitémies inférieures à 100 parasites/ μ L. Dans une autre étude menée à Madagascar, la sensibilité de 2 tests rapides (Palutop4+ et Optimal^{IT}, basés l'un sur la détection de la protéine HRP2 de *P. falciparum*, la pLDH de *P. vivax* et la pan-pLDH, et l'autre sur la détection de la pLDH de *P. falciparum* et la pan-pLDH) ainsi que celle de la microscopie a été évaluée en prenant comme méthode référence pour le diagnostic d'espèce la PCR en temps réel [61] (Annexe 2). Pour les infections à *Plasmodium non-falciparum*, la sensibilité des tests rapides était de 85,7% et 94,1% selon le test. La sensibilité de ces tests est de plus conditionnée par le polymorphisme des antigènes recherchés. Sur les isolats de *P. falciparum* de Madagascar, 9% des infections (parasitémie < 250 parasites/ μ l) seraient non détectées à cause de polymorphismes présents sur le gène codant pour la protéine PfHRP2. Le polymorphisme sur les gènes codant pour l'aldolase et la pLDH était plus modéré (Annexe 3).

La mise à disposition de ce type de tests qui ne sont pas adaptés au diagnostic des espèces minoritaires, dans de nombreux pays en zone d'endémie palustre, va contribuer à maintenir la sous-estimation de la prévalence de *P. vivax*. Cependant, ils peuvent représenter une alternative pour le diagnostic des espèces parasitaires en l'absence de microscopistes expérimentés.

La biologie moléculaire permet de déterminer avec certitude l'espèce parasitaire présente. Différentes techniques d'amplification ont été décrites. Tout d'abord, avec la PCR classique, de type nichée ou semi-nichée, et éventuellement multiplex. La PCR en temps réel a ensuite permis d'améliorer la sensibilité et peut permettre en une seule manipulation de déterminer l'espèce parasitaire présente. Ces PCR sont généralement basées sur l'amplification d'un fragment d'ADN codant pour l'ARN ribosomal 18S. Néanmoins, la PCR en temps réel nécessite un appareillage et des réactifs coûteux. Sa sensibilité est de 0.001 à 0.3 parasites par μL . La technique utilisée dans notre étude a été celle décrite par de Monbrison et al, sur laquelle nous reviendrons un peu plus loin [62]. La PCR apporte à la fois une augmentation de spécificité et de sensibilité importante dans le cadre du diagnostic des infections à *P. vivax*.

I-6- Les infections mixtes et les interactions entre espèces

Les infections mixtes et plus particulièrement celles impliquant *P. falciparum* et *P. vivax* sont dans certaines régions fréquentes. En Thaïlande, après traitement d'une infection à *P. falciparum*, *P. vivax* apparaît chez 21 à 35% des patients ; à l'inverse, après traitement d'une infection à *P. vivax*, *P. falciparum* resurgit dans 8-9% des cas. L'émergence d'une infection cryptique dépendrait de l'efficacité du traitement donné en première intention [63].

Les interactions entre espèces plasmodiales ne sont pas figées. Elles évoluent dans le temps, et peuvent différer selon les zones géographiques. La proportion des infections mixtes observées chez l'homme n'est pas simplement égale à celle attendue compte tenu de la prévalence de chaque espèce parasitaire dans une population humaine. Au sein de l'hôte, une régulation des densités parasitaires se produit, au sujet de laquelle plusieurs hypothèses ont été avancées : compétition vis-à-vis des hématies, réaction immunitaire anticorps dépendante. La plus vraisemblable est l'intervention de réactions immunes non spécifiques [64].

Des interactions « saisonnières » se produisent également. *P. falciparum* est plus souvent retrouvé en saison des pluies, au moment où la transmission est la plus intense. Lorsque la transmission diminue, la prévalence de *P. malariae* ou *P. vivax* augmente alors.

Un effet bénéfique pourrait être attribué à *P. vivax* lors de co-infections avec *P. falciparum*. Il a été observé que la présence concomitante de *P. vivax* pouvait réduire par un facteur 4 le risque de développer un paludisme sévère causé par *P. falciparum* [16]. De la même façon dans une autre étude, le risque d'échec thérapeutique après traitement d'une

infection à *P. falciparum* par artésunate-méfloquine était deux fois plus élevé pour les patients présentant une mono-infection que pour ceux co-infectés par *P. vivax* [65].

II- Le traitement des infections palustres à *P. vivax* et la résistance de ce parasite aux antipaludiques

Les recommandations existant préconisent le traitement des accès palustres à *P. vivax* par la chloroquine, avec un relais par la primaquine, seul antipaludique actif contre les hypnozoïtes hépatiques.

Concernant le paludisme, la pharmacorésistance a été définie par l'OMS comme « l'aptitude d'une souche de parasite du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet ». L'expansion de la résistance dans une population est le reflet de la quantité de médicaments utilisée dans cette population [66]. Plusieurs mécanismes interviennent :

- la sélection à travers l'utilisation massive d'un médicament en prophylaxie, et/ou à travers la persistance de concentrations sub-thérapeutiques chez les sujets traités;
- l'usage d'un médicament en monothérapie plutôt que d'une association de médicaments [67]. Ceci est particulièrement vrai pour les médicaments à demi-vie longue qui persistent plus longtemps dans le sang à des concentrations sub-thérapeutiques. La sélection des parasites résistants se produit lorsque la concentration de l'antipaludique administré est suffisante pour inhiber la multiplication des *Plasmodium* sensibles mais insuffisante pour bloquer celle des résistants, ce phénomène étant désigné sous le nom de « sélection médicamenteuse » [68].

D'un point de vue génétique, la résistance aux antipaludiques résulte de mutations spontanées qui ont pour effet de modifier la structure et l'activité, au niveau moléculaire, de la cible du médicament ou d'empêcher le médicament de parvenir à cette cible. Ces polymorphismes ont pour origine, dans la majorité des cas, le remplacement d'un seul nucléotide par un autre (SNP pour single nucleotide polymorphism). Conférant un avantage dans des conditions données (pression médicamenteuse) aux parasites l'ayant acquis, certains verront leur fréquence augmenter dans la population [69]. D'autres, parce qu'ils sont défavorables aux individus qui les portent, seront éliminés.

II-1- La chloroquine

II-1-a-Utilisation de la chloroquine

La chloroquine a été, et reste, le traitement de 1^{ère} intention du paludisme à *P. vivax* depuis 1946. Elle est encore largement utilisée et a été la molécule antipaludique la plus étudiée. Sa première utilisation remonte à 1936 chez des patients présentant une syphilis à la phase neurologique, en Allemagne, volontairement infectés par *P. vivax* [70].

La posologie est de 25 mg/kg (maximum d'1.5 g pour un adulte), pendant 3 jours comme pour *P. falciparum*. La demi-vie d'élimination de la chloroquine étant longue, sa concentration plasmatique est maintenue au dessus de la CI50 d'une souche sensible, permettant à cet antipaludique d'éliminer le risque de rechute due à un accès de reviviscence précoce (en zone tropicale, la première rechute due aux hypnozoïtes peut se produire dans les 21 jours suivant l'infection) [71].

II-1-b-Mécanismes d'action de la chloroquine

Malgré son utilisation depuis une cinquantaine d'années, la compréhension des modes d'action de la chloroquine et surtout des mécanismes de résistance n'est pas parfaitement élucidée. Chef de file des amino-4-quinoléines, la chloroquine est une base faible qui s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient de pH. Les parasites vont digérer au sein de la vacuole digestive l'hémoglobine (source d'acides aminés) ce qui induit la libération de molécules d'hème. L'hème est normalement détournée par polymérisation en une forme cristalline, l'hémozoïne (le pigment malarique). L'action principale de la chloroquine va être de bloquer cette dégradation enzymatique de l'hémoglobine, en se liant à l'hème libre (ferriprotoporphyrine IX) empêchant sa polymérisation, et ainsi la formation de l'hémozoïne. La concentration de l'hème, toxique pour le parasite, augmente, ce qui aboutit à la mort de celui-ci [72].

La chloroquine est un schizonticide sanguin aussi bien contre *P. vivax* que les autres espèces. Une activité gamétocytocide est reconnue contre les gamétocytes de *P. vivax* mais aux doses couramment utilisées pas contre ceux de *P. falciparum*. Néanmoins, après élimination des stades sanguins, les patients restent à risque d'accès de reviviscences des formes hypnozoïtes hépatiques.

II-1-c-Emergence de la résistance à la chloroquine

Alors que les premiers cas de résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* sont apparus dès les années 50 en Asie du sud-est (Thaïlande, Cambodge), en Amérique centrale et en Amérique du sud (Colombie) la chloroquino-résistance de *P. vivax* n'est apparue qu'en 1989 chez des Australiens rapatriés en Papouasie - Nouvelle-Guinée et dans les îles Salomon [73]. Elle s'est ensuite rapidement étendue en Indonésie (île de Nias), en Papouasie et en Irian Jaya en 1991 [74], au Myanmar en 1993 [75], à Bombay en 1995 [76] et à Bornéo en 1996 [77]. On suspecte aussi la présence de chloroquino-résistance en Amérique du sud: quelques cas ont été signalés en Guyane en 1996 [78], au Pérou [79] et dans la partie amazonienne du Brésil [80, 81]. La prévalence des souches chloroquino-résistantes pourrait être sous-estimée au Brésil, avec 10% d'échecs thérapeutiques récemment rapportés [82]. Toutefois, d'autres rapports ont fait état d'une persistance de la sensibilité de *P. vivax* à la chloroquine en Azerbaïdjan [83], aux Philippines [84] et en Thaïlande [85-88]. En Papouasie, en 2004, 65% des patients étaient en échec thérapeutique après 28 jours de suivi [89].

Ce délai d'acquisition de la résistance à la chloroquine trouve son explication dans un mécanisme multifactoriel et/ou suite à une pression médicamenteuse moins forte due à la précocité de la gamétocytogénèse permettant une transmission des clones sensibles.

II-1-d-Mécanismes de résistance des Plasmodium à la chloroquine

Les mécanismes de résistance à la chloroquine ont été plus étudiés pour *Plasmodium falciparum*. La résistance de ce parasite est liée à une diminution de sa concentration au sein de la vacuole digestive du parasite induisant la présence d'une concentration en principe actif beaucoup trop faible pour bloquer le processus de détoxification de l'hème en hémozoïne [90, 91]. Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- l'acquisition d'un mécanisme d'efflux rapide, phénomène de multi-drug résistance [92].
- la perte ou la réduction du mécanisme d'influx,
- l'augmentation du pH lysosomal, qui réduirait l'accumulation acido-tropique de la chloroquine.

La chloroquine peut être sous forme di-protonée, et base faible, elle va se répartir dans les compartiments intra et extracellulaires selon un gradient de pH. Elle va donc s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite (pH voisin de 5,0-5,2). On estime que la concentration de chloroquine peut être 20 000 fois plus importante dans la vacuole parasitaire que dans l'érythrocyte infecté. Une différence initiale de pH entre les souches sensibles et résistantes à la chloroquine pourrait donc être l'une des explications possibles à la moindre concentration

dans la vacuole parasitaire de l'antipaludique. Des études contradictoires ont été publiées sur le sujet [93-95], la mesure du pH à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite restant une tâche difficile. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'efflux de la chloroquine hors de la vacuole digestive et le rôle de la protéine CRT (Chloroquine Resistant Transporter) (Figure 3). Un canal transportant la chloroquine sous forme protonée à l'extérieur du parasite rendrait possible la plus faible accumulation de chloroquine chez les parasites résistants. La protéine CRT pourrait également agir comme un transporteur, la mutation K76T (sur le gène *pfCRT*) par la perte d'une charge positive rendant possible l'efflux de CQ. L'implication de cette mutation dans la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a été clairement démontrée [96]. La protéine Pgh1 pourrait participer également à l'efflux de chloroquine hors de la vacuole digestive du parasite (Figure 3). Le gène codant pour cette protéine est le gène *pfmdr1* [97]. En présence de mutations sur le gène *pfCRT* (K76T), la présence d'une mutation sur le codon 86 de *pfmdr1* modulerait le niveau de résistance à la chloroquine.

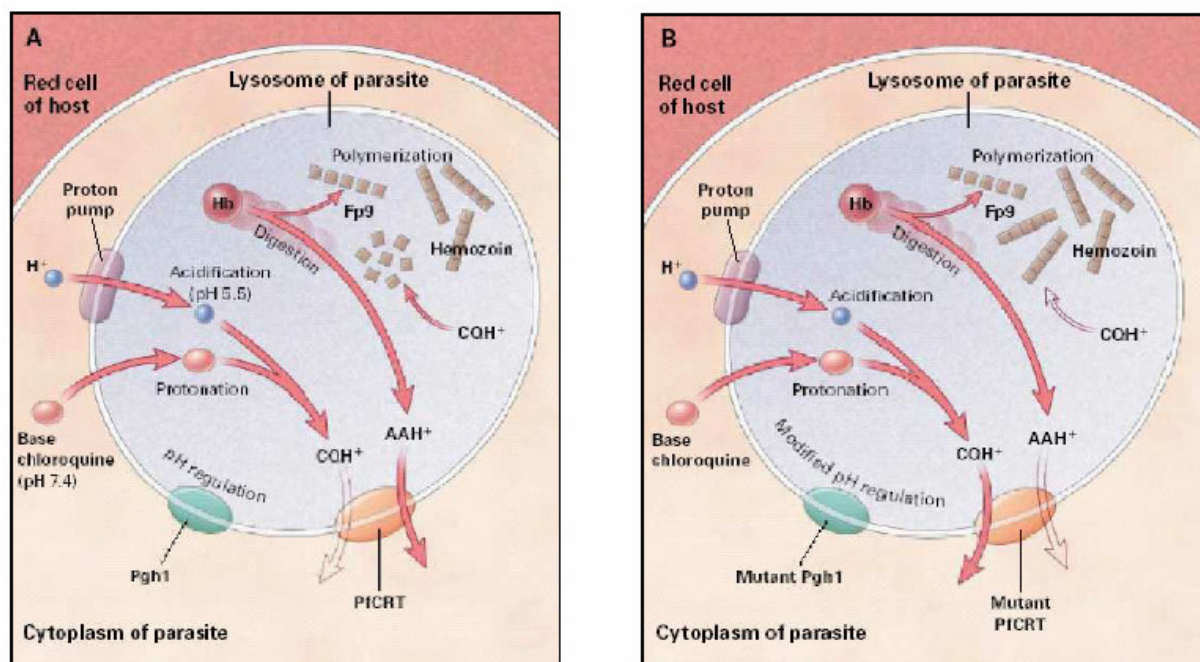


Figure 3. Mécanismes proposés pour la chloroquino-résistance ; Implication des protéines PfCRT et Pgh1.

A. Action de la protéine PfCRT dans une souche sauvage. La protéine PfCRT participe de façon majoritaire à l'élimination des acides aminés protonés et de façon minoritaire à l'élimination de la chloroquine protonée.

B. Action de la protéine PfCRT dans une souche mutée. La protéine PfCRT permet l'élimination massive de la chloroquine protonée

D'après Warhurst 2001 [98]

II-1-e-Rôle du gène *pvmdr1*

Des travaux récents ont permis de rechercher chez *P. vivax* le gène orthologue de *pfmdr1* [92, 99]. Des mutations non-synonymes ont été identifiées sur 16 codons (*Tableau 1*). Deux mutations ont été identifiées sur des positions non décrites chez *P. falciparum*: plus précisément les positions Y976F et F1076L par Brega et al. [92], dans notre laboratoire, mais en l'absence de données cliniques obtenues en parallèle, le rôle de ces mutations dans l'acquisition d'un phénotype résistant à la chloroquine n'avait pas pu être déterminé.

Tableau 1. Polymorphismes identifiés sur le gène *pvmdr1*

	Codon																Total isolats	Réf
	196	237	443	500	511	556	698	783	823	908	958	976	1076	1104	1440	1447		
Brésil	N	S	I	N	R	V	G	A	K	L	M	Y	F	L	R	E	1	[99]
	N	S	I	N	R	V	G	A	K	L	M	Y	F	L	Q	E	1	[99]
	N	S	I	D	R	V	G	A	K	L	M	Y	F	L	Q	E	1	[99]
Salvador	N	S	I	D	R	V	G	A	K	M	T	Y	F	L	Q	E	1	[99]
Guyane												Y	F				3	[92]
Thaïlande												Y	F				4	[92]
												F	L				4	[92]
												Y	L				1	[92]
												F					17	[100]
												Y					52	[100]
Azerbaïdjan												Y	L				4	[92]
Turquie												Y	L				3	[92]
PNG	N	S	I	D	R	V	S	V	K	L	M	F	L	L	Q	E	1	[99]
Indonésie	N	S	I	D	H	V	S	A	K	L	M	F	L	L	Q	E	1	[99]
												Y	F				1	[92]
												F	L				1	[92]
												F					123	[100]
												Y					5	[100]
Papouasie	N	S	I	D	H	V	S	A	E	L	M	F	L	F	Q	E	2	[99]
	S	P	T	D	H	V	S	A	E	L	M	F	L	F	Q	G	1	[99]
	N	S	I	D	H	A	S	A	E	L	M	F	L	F	Q	E	1	[99]

Brega et al. [92] ont également recherché des mutations sur les codons 91 et 189 mais aucun polymorphisme n'a pu être identifié.

Les études apportant à la fois des résultats de suivi thérapeutique *in vivo* et des données moléculaires sont trop rares, et il est difficile d'associer une valeur prédictive d'échec thérapeutique à la présence de ces mutations. Très récemment, Suwanarusk et al., 2007 [100] ont montré que la CI50 mesurée *in vitro* (par observation de la maturation des stades

schizontes) était significativement plus élevée sur les isolats porteurs de la mutation 976F que sur les génotypes sauvages (isolats collectés en Indonésie et Thaïlande). Dans une autre étude, Marfurt et al [101] ont montré une association entre la présence de la mutation 976F, associée à un génotype mutant sur le gène *dhfr*, et la survenue d'un échec thérapeutique chez des patients ayant reçu un traitement par la combinaison amodiaquine-sulfadoxine-pyriméthamine, démontrant une implication de ce gène dans la résistance aux amino-4-quinoléines de *P. vivax*.

Les données portant sur la relation entre le nombre de copies du gène *pvmdr1* et la résistance à la chloroquine sont rares, et n'ont pour l'instant pas permis de porter des conclusions probantes. Chez *P. falciparum*, une augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* a été associée à un phénomène de « multi-drug resistance » : diminution de la sensibilité du parasite à la méfloquine, la quinine, la luméfantrine, l'halofantrine, et aux dérivés de l'artémisinine [102, 103]. Suwanarusk et al., 2007 [100] ont quantifié le nombre de copie de *pvmdr1* sur 170 isolats : 15 isolats avaient un nombre de copies augmenté (13 isolats avaient 2 copies du gène, 2 avaient 3 copies). Ces 15 isolats provenaient de Thaïlande et tous étaient sauvages sur le codon 976. En ne considérant que les isolats provenant de Thaïlande (total de 66), les isolats possédant plusieurs copies du gène *pvmdr1* avaient une CI50 plus basse pour la chloroquine que les isolats ne possédant qu'une seule copie du gène. Cependant, sur le total des isolats (incluant 104 isolats d'Indonésie pour lesquels *pvmdr1* n'avait été retrouvé qu'en une seule copie), les résultats n'étaient plus significatifs. Le rôle de *pvmdr1*, dans la résistance à la chloroquine de *P. vivax*, reste donc encore à déterminer.

II-1-f-Rôle du gène *pvcr-t-o*

Le gène orthologue de *pfcr-t* chez *P. vivax* a été identifié en 2001 par l'équipe de Thomas Wellems [104] : il comporte 14 exons de 45 à 266 paires de bases, séparés par 13 introns de 114 à 491 paires de bases. 14 isolats entretenus sur modèle simien dont 3 résistants *in vivo* à la chloroquine ainsi que 8 isolats collectés chez des patients en zone d'endémie ont été séquencés sur tout ou partie du gène *pvcr-t-o* (ou *cg10*) mais aucune association entre la présence de mutations et le phénotype sensible ou résistant des souches n'a pu être trouvée (Tableau 2). Suwanarusk et al, 2007 [100] ont également séquencé la totalité du gène *pvcr-t-o* sur 32 isolats provenant de Thaïlande et d'Indonésie. Une insertion de 3 nucléotides (AAG) a été identifiée au niveau du premier exon du gène, codant pour une lysine (K) en position 10. Après séquençage d'un plus grand nombre d'isolats, cette insertion était présente chez 76%

des isolats de Thaïlande (31/41), et 2,2% de ceux d'Indonésie (1/46). Une analyse stratifiée selon l'origine géographique des souches n'a pas permis de mettre en évidence un lien entre la présence de cet insert et la mutation 976F ou avec une variation de la CI50 des souches pour la chloroquine *in vitro*.

Tableau 2. Polymorphisme du gène *pvcrt-o* et réponse *in vivo* à la chloroquine des souches de *P. vivax*

Line or sample	In vivo phenotype	Amino acid position codon		
		34	38	384
Monkey adapted				
<u>Indonesia XIX</u>	R	Q	P	L
<u>AMRII-1</u>	R	Q	P	F
Indonesia I	R	Q	P	—
<u>Chesson</u>	S	H	L	L
<u>Salvador I</u>	S	Q	P	L
New Guinea I/CDC	S	Q	P	—
New Guinea	S	Q	P	—
Sumatra	S	Q	P	—
Palo Alto	S	Q	P	—
Thai III	S	Q	P	—
India VII	S	Q	P	—
North Korea	S	Q	P	—
Brazil I/CDC	S	Q	P	—
Mauritania I	S	Q	P	—
Patient blood samples (Papua)				
<u>CL002</u>	R	Q	P	F
<u>CL004</u>	R	Q	P	L
CL026	R	Q	P	L
CL029	R	Q	P	L
<u>CL003</u>	PR	Q	P	L
<u>CL007</u>	S	Q	P	L
CL001	S	Q	P	L
CL020	S	Q	P	L

D'après Nomura et al, 2001 [104]

Une variabilité du nombre de copie du gène *pvcrt-o* ou de son expression n'a jusqu'à aujourd'hui jamais été recherchée.

II-2- La primaquine

II-2-a-Utilisation de la primaquine

La primaquine est le seul médicament disponible efficace contre les formes hépatiques (hypnozoïtes) de *P. vivax* et de *P. ovale* [105]. C'est une amino-8-quinoléine (amino-4-méthyl-1butylamino)-8 méthoxy-6 quinoléine). Produite au cours de la seconde guerre mondiale, elle a été utilisée pour la première fois par les troupes américaines pendant la guerre de Corée [106, 107].

L'OMS recommande ainsi son utilisation pour le traitement des cas de paludisme à *P. vivax* en relais après la prise de CQ pendant 3 jours ; la posologie est de 15 mg/kg/j pendant 14 jours, posologie doublée dans les zones où une diminution de l'efficacité de la primaquine est connue. Cette longue période de traitement conduit en l'absence de supervision médicale, à une mauvaise compliance de la part des patients (en l'absence de signes cliniques après un traitement efficace de l'accès primaire). En France, la primaquine n'est disponible que sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

Utilisée pourtant depuis plus de 50 ans maintenant, son mécanisme d'action ainsi que les posologies à laquelle elle doit être utilisée restent encore en partie obscures.

II-2-b-Mécanismes d'action de la primaquine

La primaquine est active sur les formes tissulaires hépatiques primaires, sur les formes tissulaires latentes responsables des reviviscences, sur les gamétocytes. Elle est aussi active sur les formes asexuées (trophozoïtes, schizontes) circulantes de *P. vivax* et de *P. ovale* mais pas sur les stades asexués circulants de *P. falciparum*. Elle pourrait agir en altérant la structure de la membrane mitochondriale des formes parasitaires [108, 109]. Une autre hypothèse, la production de radicaux libres, a également été évoquée. En l'absence de systèmes de culture répandus des formes hépatiques, et sanguines de *P. vivax* ou *P. ovale*, il est difficile d'étudier les mécanismes d'action de cette drogue. Des travaux ont cependant montré la capacité de la primaquine à réverser la résistance de parasites à la CQ, en bloquant la pompe PfCRT mutée [110]. Une piste supplémentaire pour contrecarrer la résistance de *P. vivax* à la CQ ? Il faudrait alors que le mécanisme de résistance soit semblable entre les deux espèces parasitaires ce qui, au vu des publications, n'est pas le cas.

II-2-c-Incertitudes liées au déficit en G6PD

Les incertitudes sur la place de la primaquine dans l'arsenal thérapeutique des antipaludiques sont largement liées à l'hémolyse causée chez les sujets déficitaires en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. La G6PD est la seule source de production du NADPH, H⁺ de l'hématie, coenzyme de la glutathion réductase. Cette enzyme permet la régénération du glutathion et la neutralisation des peroxydes très toxiques pour le globule rouge. Les hématies des sujets présentant un déficit de l'activité G6PD en produisant moins de NADPH, H⁺ sont plus sensibles à un stress oxydatif et à l'hémolyse lors de circonstances variées. L'effet délétère de la primaquine se ferait à la fois par la consommation de glutathion et par oxydation directe du NADPH, H⁺ [111]. Elle serait également à l'origine d'une fragilisation de la membrane des hématies et d'une diminution de leur déformabilité, responsable d'une hémolyse intra-vasculaire. Plusieurs variants génétiques sont responsables d'un déficit en G6PD, et une grande hétérogénéité clinique est observée selon la nature moléculaire du déficit [112]. Pour les variants de type A- (10 à 15% de la population africaine), l'hémolyse est modérée avec un rétablissement à l'arrêt du traitement tandis que pour les variants B- (variant dit méditerranéen), l'hémolyse est sévère et justifie de la non-utilisation de la molécule chez les patients porteurs de ce génotype [107, 113].

II-3- La sulfadoxine - pyriméthamine

II-3-a-Utilisation de la sulfadoxine-pyriméthamine

L'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP) a été utilisée, pour palier les résistances à la chloroquine, en traitement de première intention de l'accès simple à *P. falciparum* en Afrique de l'Est ou en deuxième intention en Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest. Les infections mixtes (*P. falciparum*/*P. vivax*) étant fréquentes notamment en Asie, *P. vivax* a subi la pression médicamenteuse exercée par le traitement des infections palustres à *P. falciparum*.

Un grand nombre de pays ont changé leur politique nationale de traitement du paludisme simple selon les recommandations de l'OMS par des traitements utilisant les associations avec les dérivés de l'artémisinine (ACT). Cependant, la SP reste préconisée pour le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes. Des études effectuées au Kenya et au Malawi ont montré sa capacité à réduire les taux de paludisme placentaire, d'anémie grave et de faible poids de naissance avec une efficacité comparable à la chimioprophylaxie continue [114, 115]. Néanmoins, une utilisation massive de la SP va

probablement contribuer à l'émergence de résistances avec un effet possible sur la gamétocytogénèse [116].

II-3-b-Mécanisme d'action de la sulfadoxine-pyriméthamine

La SP est l'association de deux molécules agissant à deux niveaux de la fabrication *de novo* des bases pyrimidiques du parasite à partir de précurseurs (dioxyde de carbone, glutamine et acide aspartique) et donc dans la synthèse de l'ADN et de certains acides aminés. En terme de classification, la sulfadoxine appartient à la classe des antifoliniques de type I (sulfonamides et sulfones) et la pyriméthamine à la classe II. Les premiers inhibent une enzyme nommée dihydroptéroate synthase (DHPS) mimant l'acide para-aminobenzoïque (PABA) et les deuxièmes la dihydrofolate réductase (DHFR).

L'action de ce composé s'observe tardivement au cours du cycle intra érythrocytaire du parasite, au moment du passage du stade trophozoïte âgé au stade schizonte, lorsque la synthèse d'ADN atteint son maximum. La SP doit son action à sa structure apparentée aux substrats naturels et à son affinité qui est plusieurs centaines de fois plus élevée pour les enzymes plasmodiales que pour les enzymes des cellules hôtes.

II-3-c-Résistance de *P. vivax* à la sulfadoxine-pyriméthamine

La résistance de *P. vivax* à la SP est apparue très rapidement. Dans les années 50, on a même cru à une résistance intrinsèque de *P. vivax* à la SP, en particulier à la pyriméthamine [117-120]. Par sa pharmacocinétique lente et son action sur des enzymes cibles, la SP s'est avérée capable de sélectionner rapidement des parasites résistants.

Les mécanismes de résistances des deux espèces parasitaires *P. falciparum* et *P. vivax* sont similaires ; il s'agit de mutations sur les gènes codant pour les protéines DHFR et DHPS. Ces mutations sont responsables d'un changement de conformation de l'enzyme, d'une diminution de l'affinité de la molécule antipaludique et donc d'une perte de son activité. Le gène *dhfr* de *P. falciparum* a été cloné en 1987 [121] mais ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que le gène *dhfr* de *P. vivax* a été identifié [122]. Le gène code en fait pour deux protéines : la DHFR et la thymidylate-synthase ; la partie codant pour PvDHFR est située à l'extrémité N-terminale du gène (environ 700 paires de bases) et est reliée au gène de la thymidylate-synthase par un pont de 300 nucléotides. Le domaine DHFR des deux protéines (*P. falciparum* et *P. vivax*) est en grande partie conservé (66%), avec un site actif très conservé [123].

De nombreuses études ont porté sur l'identification de polymorphismes sur le gène *dhfr* de *P. falciparum* et, malgré leur plus faible nombre concernant *P. vivax*, de nombreux polymorphismes ont été identifiés : les parasites mutés peuvent être porteurs de 1 à 5 mutations (*Tableau 3*). Un alignement des séquences protéiques des deux espèces montre que les codons mutés en positions 59, 108 et 164 chez *P. falciparum* correspondent aux codons 58, 117 et 173 de *P. vivax*.

Tableau 3. Géotypes identifiés sur le gène dhfr dans les différentes zones de transmission de *P. vivax*.

allele <i>dhfr</i>	Méthode		Résistance <i>in vitro</i>	
	RFLP	FRET	séquençage	Levure Bactérie
33L	Madagascar, Comores (1999)			
57L	Thaïlande (1998), Inde (2001), Ethiopie (2006)			52
57L/58R	Thaïlande (1992-1998)		Indonésie (1999), Inde (2004), Sri Lanka (2005), Papouasie Nouvelle Guinée (1998)	1,3-1,9 12
57L/58R/117N	Thaïlande (1995-1998), Inde (2003)		Myanmar (2004)	
57L/58R/61M/117N	Thaïlande (1992-1998)	Myanmar (2004)	Indonésie (1999), Inde (2004), Inde (2003), Vanuatu (2005), Vietnam (2002)	
57L/58R/61M/117T			Thaïlande (2005)	>500
57I/58R/61M/117T			Thaïlande (2005)	
58R	Inde (2002)		Timor oriental (2001), Inde (2004), Indonésie (2000), Vietnam (2002)	
58R/117N	Brésil (1982), Thaïlande (1998), Myanmar (1998), Cambodge (1998), Inde (2001), Ethiopie (2006), Inde (2002)		Indonésie (1999), Colombie (2005), Inde (2004), Vanuatu (2005), Chine (1994), Papouasie Nouvelle Guinée (1998), Vietnam (2002), Thaïlande (2005)	100-460 15 / 325
58R/117T	Thaïlande (1992-1998)		Vietnam (2002)	43
58R/117N/173L	Guyane française (1998)	Myanmar (2004)		500
61M	Ethiopie (2006)			
117N	Inde (2001), Inde (2002)	Turquie (2000), Azerbaïdjan (2002)	Sri Lanka (2005), Indonésie (1999), Chine (1994), Inde (2004), Timor oriental (2001)	87 4000
117T			Vanuatu (2005), Thaïlande (2005)	40
13L/57L/58R/61M/117T			Thaïlande (2005)	
15S/57L/117T/173F			Indonésie (2000)	
38G/58R/109H/159A			Inde (2004)	
49R/57L/58R/61M/117T			Indonésie (1996-1999)	
50K/117N			Indonésie (1999)	
57L/117N			Indonésie (1999)	
57L/117T			Papouasie Nouvelle Guinée (1998), Vietnam (2002)	
57L/58R/61M/117N			Myanmar (2004)	
57L/111L/117T/173F			Indonésie (2000)	>500

allele <i>dhfr</i>	RFLP	Méthode		Résistance <i>in vitro</i>	
		FRET	séquençage	Levure	Bactérie
57L/58R/109C			Inde (2004)		
57L/58R/117T			Indonésie (1996-1999)	200-300	
58R/61M/117T			Indonésie (1996-1999), Vietnam (2002), Thaïlande (2005)		
58R/117N/99S			Indonésie (2000)	81	
58R/117N/159A			Inde (2004)		
58R/117N/171L			Inde (2004)		
58R/117N/188V			Inde (2004)		
58R/117N/199V			Indonésie (1996-1999)	200-300	
109H			Inde (2004)		
131G			Inde (2004)		
199V			Indonésie (2000)		
49G/58R/117N			Thaïlande (2005)		

Mise à jour d'après Hawkins et al, 2007 [124]

Pour comprendre le rôle de ces mutations dans l'acquisition d'un phénotype résistant par *P. vivax*, des modèles utilisant la levure ou des bactéries ont été construits. Cependant, les résultats peuvent être très variables. Il ressort logiquement que lorsque le nombre de mutations augmente sur le gène *pvdhfr*, l'organisme utilisé comme modèle exprime une résistance plus importante à la pyriméthamine. *In vivo*, d'autres facteurs interviennent pouvant moduler la résistance des parasites à la SP, avec bien sûr une intervention de l'immunité de l'hôte mais aussi une influence de son état de malnutrition, de variations pharmacocinétiques sur le métabolisme de la SP. Le génotype quadruple muté 57L/58R/61M/117T a cependant été clairement associé à la survenue d'échecs thérapeutiques. Les parasites porteurs de 4 mutations sur le gène *dhfr* ont été décrits essentiellement en Asie du sud est et en Indonésie (Figure 4). Le Moyen-Orient et l'Amérique du sud semblent encore préservés.

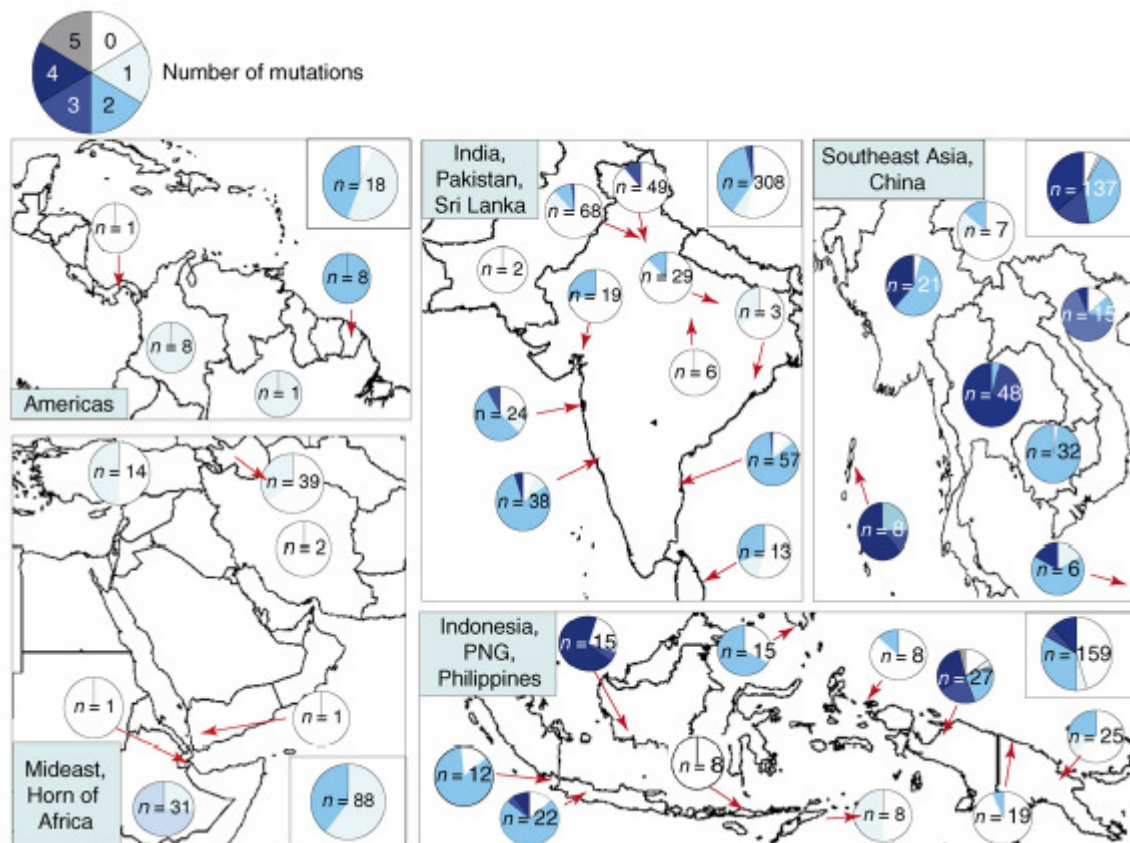


Figure 4. Répartition des génotypes sauvages à quintuple muté identifiés sur le gène *pvdhfr* dans les principales zones de transmission de *P. vivax*

D'après Hawkins et al, 2007 [124]

Concernant le gène *pvdhps*, moins de sites de mutations ont été identifiés. Le gène, caractérisé en 2004 [125], a une structure très proche de celui de *P. falciparum* et est divisé en deux parties : une partie codant pour l'enzyme DHPS à l'extrémité C-terminale, et une partie codant pour une hydroxyméthyl-dihydroptérine pyrophosphokinase côté N-terminal. Les positions mutées identifiées ont été les acides aminés : A383G, A553G. L'acide aminé en 585 était déjà une valine, correspondant au codon 613 muté de *P. falciparum*. Ces mutations ont été retrouvées sur des isolats du Timor Oriental, du Brésil, de Papouasie, de Chine, des Philippines, de Papouasie Nouvelle Guinée et de Thaïlande. En 2005, Imwong et al [126] ont confirmé la présence de ces mutations sur des isolats de Thaïlande, mais n'ont mis en évidence aucun polymorphisme sur les acides aminés 383 et 553 sur des isolats provenant de Madagascar ou des Comores (n=2), Belem et Sal, d'Inde (n=5) et d'Iran (n=2). La mutation en 383 a été également mise en évidence sur 4 isolats provenant du Vietnam [127]. Menegon et al, 2006 [128] ont mis en évidence un polymorphisme supplémentaire au niveau du codon 647 : A647S et A647P sur des isolats provenant d'Arménie (n=4), Ouzbékistan (n=1), Turquie (n=3), Azerbaïdjan (n=6), Éthiopie (n=1), Papouasie Nouvelle Guinée (n=1) et Thaïlande (n=1). Un polymorphisme de longueur existe sur la séquence de *pvdhps* (entre les nucléotides 603 et 644, en prenant comme référence la séquence n°AY186730). Le motif répété comporte 7 acides aminés : GE(A/G)KLTN. Ce motif pourrait être utilisé pour la surveillance de la propagation des isolats mutés.

La SP n'ayant jamais été recommandée pour le traitement des cas de paludisme causés par *P. vivax*, peu d'études *in vivo* ont été menées. Dans une étude publiée en 2002, Tjitra et al [129] ont montré après traitement des patients par artésunate-SP que les patients porteurs d'un génotype quadruple muté 57L/58R/61M/117T étaient significativement plus exposés à un risque d'échec thérapeutique. De la même façon, Hastings et al., 2004 [130] ont montré sur 24 patients traités à la SP que le risque d'échec thérapeutique était plus élevé pour les patients infectés par des parasites quadruples mutés que par des parasites porteurs de 3 ou moins mutations. Les données concernant l'imputabilité d'échecs thérapeutiques en fonction du génotype du gène *dhps* sont plus rares. Cependant, Imwong et al., 2005 [126] ont montré que les isolats mutés sur le gène *dhps* (au niveau des codons 383 et 553) étaient plus souvent mutés sur *dhfr* (génotype quadruple muté). Les patients porteurs de mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* avaient trois fois plus de risques de subir un échec thérapeutique que les sujets porteurs de parasites non mutés.

II-4- Les autres antipaludiques disponibles

Malgré une résistance croisée entre l'amodiaquine et la chloroquine, des études réalisées en Indonésie montrent une efficacité supérieure de l'amodiaquine. Cependant, dans des régions où la résistance de *P. vivax* à la chloroquine est importante, le taux d'échecs thérapeutiques peut atteindre les 25% de patients traités après 28 jours de suivi. La monothérapie par l'amodiaquine ne doit donc pas être préconisée. Une efficacité thérapeutique plus importante est conservée sur *P. vivax* en utilisant des traitements comme la méfloquine [131], l'halofantrine [132] ou encore l'association atovaquone-proguanil [133]. Néanmoins, le coût d'un traitement avec ce dernier rend son utilisation complètement impossible. Pukrittayakamee et al [134, 135], ont étudié l'efficacité thérapeutique de 13 molécules ou combinaisons antipaludiques ou antibiotiques pour le traitement du paludisme à *P. vivax* chez des patients infectés en Thaïlande. L'efficacité était évaluée par mesure de la clairance parasitaire qui en l'absence de séquestration du parasite dans les capillaires profonds serait un bon reflet de l'activité antipaludique de la drogue testée. La clairance la plus rapide a été observée pour les dérivés de l'artémisinine, puis pour la chloroquine et les autres antipaludiques (*Figure 5*). Les antibiotiques ainsi que la SP (mais des parasites résistants à cet antipaludique ont été décrits en Thaïlande) induisaient une clairance parasitaire plus longue.

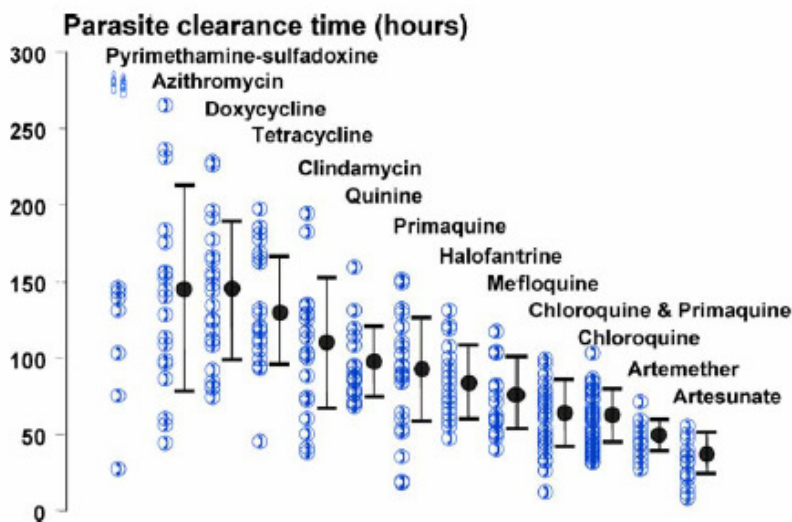


Figure 5. Clairance parasitaire de P. vivax après traitement par différentes molécules antipaludiques ou antibiotiques.

D'après Pukrittayakamee et al, 2004 [63]

L'OMS préconise le changement des politiques nationales de traitement des cas de paludisme à *P. falciparum* par l'utilisation des combinaisons à base des dérivés de l'artémisinine. En pratique, le diagnostic d'espèce est rarement réalisé en zone d'endémie. Les ACT seront donc largement utilisés pour le traitement de cas de *P. vivax*. Très peu d'études ont jusqu'à ce jour été consacrées à l'efficacité des ACT sur *P. vivax*. Concernant l'efficacité des dérivés de l'artémisinine utilisés en monothérapie, une étude [136] a mis en évidence en Thaïlande, une bonne efficacité du traitement par l'artésunate, administré seul, sur l'infection par *P. vivax* avec une disparition rapide de la fièvre et de la parasitémie. Cependant, sur un suivi de 28 jours, des cas de reviviscence étaient observés (42 patients inclus). Une observation similaire a été réalisée à partir d'un protocole *in vivo* conduit au Vietnam [137].

Seules 3 études ont porté sur les ACT : artésunate-SP pour deux d'entre elles [129, 138], et dihydroartémisinine-pipéraquline ou artéméther-luméfántrine pour la troisième [139]. Les deux combinaisons artéméther-luméfántrine et DHA-pipéraquline ont conduit à une réponse clinique rapide. Cependant, à la fin du suivi (de 42 jours), le taux de récurrence de parasitémies était plus important avec l'association comprenant la luméfántrine. Cela s'explique par la différence de demi-vie d'élimination des deux molécules associées aux dérivées de l'artémisinine : d'une part une demi-vie d'environ 4 jours pour la luméfántrine, et d'autre part, une demi-vie de 28 à 35 jours pour la pipéraquline. L'élimination lente de cette deuxième molécule va agir en « prophylaxie » post-traitement, limitant les accès de reviviscence liés au relargage de formes hypnozoïtes et les risques de développer un accès palustre lié à une nouvelle infection. Le même type d'observation a été fait à partir d'une étude comparant l'efficacité de l'association DHA-pipéraquline versus artésunate-amodiaquine [140]. Malgré une bonne efficacité précoce de ces traitements, la demi-vie courte de l'amodiaquine (environ 18 jours) a pour conséquences une observation de récurrence de parasitémies chez les patients traités, de l'ordre de 45% des patients (contre 13%).

Certes, une demi-vie d'élimination longue peut entraîner plus rapidement la sélection de clones résistants (comme cela a pu être observé dans le passé avec l'utilisation répandue de la SP). Cependant, en présence de dérivés d'artémisinine qui vont réduire considérablement et rapidement (demi-vie très courte), la quantité de parasites présents chez le malade, la probabilité de sélectionner par conséquence de la deuxième molécule des clones résistants est largement diminuée. De plus, diminuer la possibilité des reviviscences contribue à une diminution de la transmissibilité du parasite à l'anophèle.

III- Méthodes d'évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium sp* aux antipaludiques

La surveillance de la chimiosensibilité des *Plasmodium* aux antipaludiques comporte trois approches : les tests *in vivo*, les tests *in vitro*, tout en prenant en compte les propriétés pharmacocinétiques des médicaments, et la recherche de marqueurs moléculaires. Au niveau local, cette surveillance passe par l'établissement de sites sentinelles [141] sur lesquels pourront être mis en place les différents types de surveillance (complémentaires). Un réseau de surveillance à l'échelle mondiale est actuellement en train de voir le jour (World Antimalarial Resistance Network, WARN) [142]. Il s'agit d'établir une base de données comportant à la fois les résultats des tests d'efficacité thérapeutique, la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance, les résultats de tests *in vitro* incluant des souches de références en plus des isolats collectés et les résultats d'études pharmacocinétiques dans les populations cibles. L'objectif est de fournir aux réseaux de surveillance locaux et aux décideurs politiques des données standardisées, et de permettre un suivi géographique et temporel de la propagation des résistances aux antipaludiques. Néanmoins, ce réseau est pour l'instant prioritairement dédié à *P. falciparum*.

III-1- Test *in vivo*

Le test *in vivo* consiste à évaluer directement l'efficacité thérapeutique des médicaments, administrés à des doses connues, chez des sujets impaludés ; il s'agit donc d'une évaluation prospective. Cette efficacité est appréciée selon la réponse clinique et parasitologique du patient. Cela nécessite un suivi régulier des patients sur une durée de 28 voire 42 jours, selon les recommandations établies par l'OMS en 2001 [141] dans le cas du paludisme à *P. vivax*. Le laps de temps nécessaire pour évaluer la réponse au traitement *in vivo* a récemment fait l'objet de discussions. L'élimination d'un médicament est le paramètre qui définit la durée du suivi dans les tests d'efficacité thérapeutique. La durée nécessaire pour éliminer complètement un médicament de l'organisme correspond à 6 fois sa demi-vie d'élimination. Ainsi, pour la SP, avec une demi-vie approximative de 100 heures (4 jours) pour la sulfadoxine, l'élimination prendra 24 jours ; le suivi doit donc être au minimum de 28 jours. Les périodes de suivi doivent permettre aux concentrations sanguines de médicaments

de chuter au dessous du seuil thérapeutique minimum. Toute recrudescence des plasmodies avant que ce seuil n'ait été atteint serait due à une pharmacorésistance.

La conduite des tests *in vivo* est lourde et il est important de rappeler que de nombreux facteurs rendent délicate l'estimation du niveau réel d'efficacité de la drogue considérée. Le statut immunologique du patient, les interférences pharmacologiques touchant les principes actifs étudiés (malabsorption, problème de métabolisation, d'élimination, interaction médicamenteuse...). Il est donc très important de pouvoir doser le principe actif (médicament administré ou son métabolite) chez les patients afin de détecter des variations de sa pharmacocinétique ou une mauvaise compliance (bien que ce facteur soit pallié par l'absorption des médicaments effectuée sous contrôle médical). Ainsi, l'existence d'une parasitémie en présence de taux sanguin de CQ et de déséthylchloroquine à 100 ng / mL (concentration minimale efficace) ou plus est considérée comme un échec thérapeutique et traduit la résistance du parasite au traitement.

Parallèlement, il faut noter que l'évaluation de la chloroquino-résistance *in vivo* est toujours probablement sous-estimée car il est difficile de distinguer correctement une recrudescence d'une réinfection en milieu tropical. Dans le cas de *P. vivax*, le problème des cas de reviviscence se surajoute ; comme nous l'avons vu, le phénomène de reviviscence est lié à la réactivation des formes hypnozoïtes du parasite, jusqu'alors restées à l'état quiescent au niveau hépatique. Il peut s'agir de la même population parasitaire que celle ayant causé l'accès palustre primaire, mais comme le montrent les études récentes [11, 12], une autre population parasitaire peut apparaître. Il est impossible de la distinguer d'une nouvelle infection ayant pu se produire si le suivi a lieu en zone de transmission.

Toutefois, le génotypage des parasites présents dans les prélèvements de sang recueillis au jour 0 et au jour de la réapparition de la parasitémie est recommandé. Il a ainsi été défini en 2007 [143] :

- une nouvelle infection, si les allèles présents au moment de la réapparition d'une parasitémie étaient différents de ceux du prélèvement au jour d'inclusion, pour un au moins des loci étudiés,
- une recrudescence, si au moins un allèle à chaque locus était commun entre les isolats du jour d'inclusion, et ceux du jour de l'échec parasitologique.

Le génotypage doit permettre de screener les gènes *msp1*, *msp2* et *glurp* dans le cas de *P. falciparum*. Des marqueurs microsatellites peuvent également être utilisés. Concernant *P. vivax*, aucune recommandation n'est établie. Sur le modèle de *P. falciparum*, le génotypage est fait à partir des séquences des gènes codant pour des protéines de surface du mérozoïte (MSP1 et MSP3) ou du sporozoïte (CSP) [144] ; il est également envisageable d'utiliser des microsatellites dans ce génotypage [145].

III-2- Test *in vitro*

Le test *in vitro* correspond au test de phénotypage, qui consiste à évaluer la sensibilité des isolats de *Plasmodium* testés en les mettant en culture en présence de concentrations croissantes des molécules antipaludiques étudiées (seule ou en association). Ils permettent de mesurer l'effet direct d'une drogue sur les parasites. Différentes méthodes permettent de détecter alors la croissance parasitaire : microscopie, isotopie (incorporation d'hypoxanthine tritiée durant la croissance parasitaire), fluorimétrie (liaison de fluorochromes tels le PicoGreen [146] ou le SybrGreen [147-149] à l'ADN parasitaire), techniques ELISA (à l'aide d'anticorps anti-HRP2 ou pLDH [150, 151])...

Un obstacle majeur à leur réalisation sur des isolats de *P. vivax* est l'absence d'un système de culture en continue du parasite. En effet *P. vivax*, à la différence de *P. falciparum*, envahit de préférence les réticulocytes. Des systèmes de culture *in vitro* ou *ex vivo* à court terme (6-8 générations) ont été développés récemment mais ils sont difficiles à exploiter du fait de la nécessité d'un ajout périodique de réticulocytes humains pendant la phase schizogonique du parasite [152]. En effet, la concentration des réticulocytes dans le sang périphérique en conditions normales est d'environ 0,5-1,5% et donc insuffisante pour propager *in vitro* *P. vivax* [153]. Ces tests sont donc actuellement menés sur environ 48 heures (une seule génération parasitaire) évitant ainsi le problème lié à la ré-invasion de nouvelles hématies par les mérozoïtes.

Récemment, une alternative à l'obtention de réticulocytes présents dans du sang de cordon a été développée [154]. Il s'agit de produire des réticulocytes à partir de cellules souches érythroïdes sous l'influence de plusieurs facteurs de différenciation (Il-3, SCF, EPO). Ces cellules souches ont été isolées de sang de cordon, mais après 20 jours de culture, leur nombre était multiplié *in vitro* par un facteur 1500, avec un maximum de réticulocytes

obtenus à 14 jours. La proportion de réticulocytes ajoutés au milieu de culture est cependant restée faible, constituant un facteur limitant pour la croissance du parasite. De plus, la croissance intra-érythrocytaire de *P. vivax* nécessite une déformabilité importante des hématies, capacité réduite chez les érythroblastes produits, avec là aussi un impact sur les parasitémies observées. Cette méthode constitue cependant une alternative intéressante pour la surveillance de la résistance, mais également pour comprendre les interactions cellulaires hôte-parasite.

Une douzaine de publications rapportent des résultats de tests *in vitro* menés sur des isolats de *P. vivax* [85, 87, 88, 100, 146, 153, 155-159]. Afin d'améliorer la croissance ou tout au moins la maturation des formes parasitaires, différentes compositions de milieu de culture ont été testées (RPMI, Waymouth, McCoy), une plus grande quantité de sérum ou d'albumax a été retenue, l'hématocrite a été ajusté. Kosaiavee et al, 2006 [146] ont adapté une technique de détection de la croissance parasitaire au PicoGreen aux tests *in vitro* de *P. vivax*. Ils ont observé une CI50 de leurs isolats pour la chloroquine similaire à celle obtenue par détection en microscopie ou par méthode isotopique ; en revanche, le nombre de tests interprétables était inférieur (45,5% versus 57% pour la microscopie). Suwanarusk et al [100] ont récemment réussi à mener des tests *in vitro* sur 247 isolats sur lesquels 91% étaient interprétables. La durée du test *in vitro*, standardisée dans le cas de *P. falciparum*, a été adaptée à chaque isolat testé : le test était arrêté lorsque 40% des parasites étaient au stade schizonte dans le puits contrôle (sans molécule antipaludique) soit 26 à 36 heures après le début de l'incubation. Cependant, l'interprétation des tests due à la non-synchronisation des formes lors de la mise en culture des isolats reste difficile. Il est probable qu'en fonction des stades parasitaires présents au moment de l'incubation la réponse des parasites ne soit pas la même du fait du mécanisme d'action de la drogue.

Différentes études utilisant simultanément une évaluation *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer la relation souvent délicate entre ces deux types de suivi de la sensibilité plasmodiales aux antipaludiques [160]. La variété des tests *in vitro* réalisés souvent de façon non standardisée en l'absence de souches de références entretenues en continu au laboratoire, la multiplicité des paramètres pouvant influencer une réponse clinique, peuvent expliquer la variabilité des résultats constatés. Les techniques *in vitro* fournissent des résultats non corrélés systématiquement aux résultats *in vivo* (surtout chez des sujets immuns) : une résistance décelée en laboratoire pour un isolat donné ne sera pas source systématique d'échec clinique et inversement, l'absence de réponse clinique et parasitaire adéquate (RCPA) observée chez

un patient ne sera pas systématiquement confirmée lors d'études *in vitro*. Il est donc difficile d'attribuer une probabilité d'échec clinique en fonction de la CI50 ou même de la CI90 calculées lors de l'interprétation de tests *in vitro*. Cependant, à l'échelle de la population, ces résultats vont refléter la sensibilité des souches, et surtout permettre de suivre leur évolution.

Ces deux types de surveillance agissent donc de façon complémentaire, et abordent le phénomène de la chimiorésistance sous un angle différent [161]. Les résultats des études *in vitro* doivent servir d'index et constituer ainsi un système d'alarme permettant de prédire l'émergence et la dissémination des souches résistantes. Ils vont permettre de détecter des souches résistantes sur lesquelles des marqueurs moléculaires de cette résistance vont pouvoir être recherchés. Le standard de référence de la surveillance de la résistance reste la classification des réponses thérapeutiques selon le protocole de l'OMS, qui permettra de déclencher l'alerte et de modifier les choix thérapeutiques devant une augmentation importante de la fréquence d'échecs thérapeutiques observés.

III-3- Recherche de marqueurs moléculaires de résistance

La recherche de marqueurs moléculaires est basée sur la détection de mutations associées à une résistance à des antipaludiques chez les parasites qui les ont acquises. Ces marqueurs moléculaires de résistance sont utilisés comme moyen de surveillance de l'évolution de la chimiorésistance des parasites du paludisme. L'identification de marqueurs moléculaires a été laborieuse et est passée par l'identification de gènes (à partir d'observations faites sur d'autres organismes), impliqués dans le métabolisme des drogues et en comparant les profils de souches sensibles et résistantes. Des différences dans l'expression des gènes de résistance sont également recherchées. La relation entre les mutations et un phénotype résistant a également pu être démontrée dans certains modèles, *in vitro*, passant par des transformations génétiques, et l'expression chez la levure des protéines correspondantes mutées.

Cependant, différents facteurs modulent la relation entre le génotype des souches et la réponse clinique observée chez le patient. Citons entre autres : l'acquisition d'une prémunition en zone d'endémie palustre, la compliance au traitement, la pharmacocinétique du médicament, l'état du patient (malnutrition...).

Djimde et al, 2001 [162] ont proposé un indice génotypique calculé comme le rapport entre la prévalence d'un marqueur moléculaire et la résistance parasitologique ou la résistance clinique. Le principe était basé sur une stabilité de l'indice (si le nombre de parasites mutants augmente, alors le taux d'échecs thérapeutiques augmente également, d'où un équilibre de l'indice) avec lequel, mesurant la prévalence d'un marqueur moléculaire dans une population parasitaire, on pouvait prédire le taux d'échecs thérapeutiques attendu. Les mutations n'étant pas le seul facteur intervenant dans la survenue d'un échec thérapeutique, l'utilisation de ce type d'indice est à considérer avec précaution.

En conclusion, 4 types d'indicateurs sont actuellement utilisés pour surveiller l'émergence et la propagation de la résistance aux antipaludiques mais leur cinétique est différente [163] :

- les marqueurs moléculaires de résistance,
- les tests de chimiosensibilité *in vitro*,
- le taux d'échecs parasitologiques,
- le taux d'échecs cliniques.

D'autres indicateurs peuvent être considérés (perception de l'efficacité d'un traitement par les populations, mortalité attribuée au paludisme, mortalité infantile) mais leur manque de spécificité ou leur subjectivité les excluent d'une utilisation épidémiologique (*Tableau 4*).

Dans une zone à forte transmission, les infections sont très souvent polyclonales et le taux d'échecs parasitologiques va constituer un marqueur qui augmente plus précocement et plus vite que la proportion de parasites mutants. Le taux d'échecs cliniques est décalé, les auteurs estimant qu'une proportion de 30% des patients peut guérir spontanément grâce à leur immunité. De plus, en zone de forte transmission où les infections polyclonales seront fréquentes, des clones minoritaires ne seront pas détectés lors du génotypage et une parasitémie récurrente pourra être classée à tort en nouvelle infection. Cela entraînera un retard dans la prise de conscience de l'émergence de résistances. Les tests *in vitro* en s'affranchissant de l'immunité de l'hôte vont permettre de détecter l'émergence de résistances précocement. Les mutations génétiques associées à la résistance seront détectées de façon plus tardive, mais il est facile d'obtenir des résultats sur un grand échantillonnage sans que cela nécessite le suivi de patients pendant au moins 28 jours, principale contrainte des tests *in vivo*. Cependant, la validité des marqueurs notamment moléculaires doit être validée à une échelle locale.

Tableau 4. Avantages et inconvénients des différents indicateurs disponibles pour surveiller la résistance des souches plasmodiales aux antipaludiques.

D'après Hasting et al, 2007 [163]

	Timeliness of response	Magnitude of change	Advantages	Disadvantages	Recommended use in policy development
Frequency of resistant allele, determined by molecular genotyping	+	Large	The ultimate driver of drug resistance. Cheap and easy to collect	Molecular basis may be unknown or incomplete, especially for new drugs	Yes, early warning
In-vitro drug sensitivity	++	Large	Can detect the small changes in drug tolerance that may precede parasitological/clinical resistance	Expensive, requires laboratory facilities, time-consuming; sample sizes are consequently small. Can give false-positive results if the changes in sensitivity do not yet result in parasitological/clinical failure	Yes, especially if molecular markers are lacking, and if resources allow
Parasitological failure rates	++	Large	The first indicator to rise, giving early warning	Requires long patient follow-up, therefore typically small sample sizes	Yes, early warning
Clinical failure rates	±	Moderate	Highly correlated with morbidity and mortality at a population level	Observed failure rates are lower than true failure rates because molecular typing misses minority clones. Highly dependent on population (eg, age, immunity) and setting (endemicity). Requires long patient follow-up, therefore typically small sample sizes	Yes
Drug efficacy as perceived by community members	-	Very small	Easy to measure, politically important	Extremely subjective and unreliable	Do not use
Malaria-attributed mortality	±	Moderate (increasing with coverage of prompt treatment with the antimalarial drug of interest)	Clinically important	Difficulties in diagnosis will obscure the true rise. Requires demographic surveillance with very large sample sizes	Do not use
All-cause mortality for children under 5 years old	-	Small	Can be precisely measured in large-scale household surveys. Such surveys are routinely done in many countries with endemic malaria	Confounded with trends in non-malarial causes of child deaths—eg, following improvement of immunisation coverage. Delay in detection of trends because of retrospective measurement in birth-history surveys	Do not use

++=very fast. +=fast. ±=moderate. -=slow.

Table: Summary and appraisal of the different sources of data related to the spread of antimalarial drug resistance and consequent mortality impact

IV- Le génotypage des souches de *P. vivax* : apport des gènes *csp*, *msh3a*, *msh1* et des marqueurs microsatellites

Différents gènes codant des protéines de surface parasites ont été utilisés pour le typage des souches de *Plasmodium*. Les applications sont essentiellement des études de génétique de population avec un intérêt très important pour le développement de candidats vaccinaux. Le polymorphisme antigénique identifié va en effet refléter un échappement possible à une réponse immunitaire. Comme nous l'avons vu, dans le cadre des tests d'efficacité thérapeutique, l'utilisation des marqueurs moléculaires est recommandée pour le génotypage des souches (comparaison des profils génétiques de la souche responsable de l'accès palustre initial et de la souche responsable d'un échec thérapeutique).

Alors que les gènes codant pour les protéines de surface sont du fait de la pression exercée par l'immunité soumis à une forte pression de sélection, des marqueurs neutres tels que des séquences microsatellites peuvent également être étudiés.

IV-1- Apport des gènes *csp*, *msp3a*, *msp1*

IV-1-a- Le gène *msp1* (merozoite surface protein 1)

MSP-1 est l'un des candidats vaccinaux les plus prometteurs contre les formes parasitaires érythrocytaires. La structure primaire du gène *pvmsp1* de taille importante (environ 5000 paires de bases) révèle des régions conservées, semi-conservées et d'autres polymorphiques. Ce gène montre une organisation similaire à celui de *P. falciparum* et *P. yoelii* comportant des blocs dits conservés entre les espèces [164].

Le gène *msp1* est exprimé en une protéine de 190 à 200 kDa à la surface parasitaire. Étudiée chez *P. falciparum*, la maturation de la protéine MSP1 met en jeu deux clivages protéolytiques successifs. MSP1 est clivée en 4 fragments de 83, 30, 38 et 42 kDa. Ce dernier fragment est lui-même l'objet d'un second clivage avant le processus d'invasion de l'érythrocyte par le parasite résultant en deux fragments de 33 et 19 kDa. Le fragment de 19 kDa est celui qui reste présent à la surface du mérozoïte pendant la phase d'invasion érythrocytaire [165].

Les fragments de 42 et 19 kDa ont été l'objet de plusieurs études dans le but de l'obtention de vaccins ; ils semblent être relativement conservés et leur inhibition par des anticorps empêche l'invasion des érythrocytes par le parasite. Des études sur la réponse immunitaire acquise après exposition à des protéines recombinantes représentant des régions polymorphiques ou au contraire conservées de PvMSP1 ont montré que les régions polymorphes étaient plus immunogènes.

Le polymorphisme des protéines MSP1 des différentes espèces plasmodiales semble être entretenu par une sélection positive naturelle, exercée par le système immunitaire de l'hôte [166]. Afin d'étudier la diversité génétique des isolats, ce sont essentiellement les séquences comprises entre les blocs conservés 5 et 6 qui ont été étudiées et publiées dans la littérature [167-169]. Elles ont permis de mettre en évidence 2 grands types de souches à partir du séquençage des souches de référence Belem et SaII ; Belem est caractérisée par une région riche en glutamine. Le nombre de répétitions de cette glutamine est variable, entraînant un polymorphisme de taille de ce fragment qui permet de classer les souches en sous-types. De la même façon, dans les souches proches de SaII, un polymorphisme nucléotidique existe, se manifestant également par des insertions. Des recombinaisons alléliques entre les deux grands types de souches ont été mises en évidence, au niveau de séquences nucléotidiques semblables permettant l'existence de ces recombinaisons.

L'analyse des séquences comprises entre les blocs 2 et 4, ainsi que celle comprises entre les blocs 8 et 10 ont démontré le même polymorphisme des souches, à savoir deux grands ensembles de types Sali et Belem, et des recombinants. Une étude récente [165] s'est intéressée à la sous-unité de 42 kDa à la fois chez *P. falciparum* et *P. vivax*, en reprenant les isolats séquencés par Putaporntip et al. en 2000 et 2002 [170, 171]. Ils ont ainsi mis en évidence des différences sur la fréquence des mutations sur les sous-unités de 19 kDa et 33 kDa de ces deux parasites ; la sélection serait plus marquée pour *P. falciparum* sur la sous-unité de 19 kDa mais ce serait le contraire sur le fragment codant pour la sous-unité de 33 kDa. Cette sélection a été estimée par calcul du ratio entre les mutations synonymes et non synonymes.

IV-1-b- Le gène msp3α (merozoïte surface protein 3)

Plusieurs protéines de surface du mérozoïte ont été identifiées chez *P. vivax* incluant PvMSP1, la famille PvMSP3-abg, PvMSP4, PvMSP5 et PvMSP9 [164].

Le gène *pvmmsp3α* fait partie d'une famille de gènes Msp3 (a, b, g) génétiquement proche de la protéine PfMsp3 de *P. falciparum*. Les protéines ont globalement 35-38% d'homologie, et comparées 2 à 2, 48-53% d'homologies. Dans les infections dues à *P. falciparum*, cette protéine est connue pour être impliquée dans un phénomène d'immunité naturelle passant par une immunité à médiation cellulaire anticorps dépendante. Cela fait de cette protéine un candidat intéressant pour le développement de vaccins.

L'amplification et le séquençage du gène *mmsp3α* de souches de laboratoire ou d'isolats de patients ont révélé un polymorphisme important ; cependant la diversité observée est maintenue majoritairement dans le domaine central de la protéine [172].

Selon un critère de taille, on peut distinguer 3 types de souches : A (1900 pb), B (1400 pb) et C (1100 pb). Les souches de type A semblent être majoritaires (75% en Thaïlande [173]) tandis que celles de type B et C représenteraient respectivement, dans l'exemple de la Thaïlande, 6,5% et 18,7% des souches circulantes. Ces proportions étaient conservées dans une étude réalisée en Papouasie - Nouvelle Guinée [174]. Une étude sur 52 isolats du Vénézuéla distinguait 9 haplotypes différents comportant au total 231 positions nucléotidiques polymorphiques [175].

IV-1-c- Le gène *csp* (*circumsporozoite surface protein*)

CSP est le polypeptide le plus abondant à la surface des sporozoïtes. Les gènes *csp* ont été clonés sur plusieurs espèces plasmodiales et notamment *P. vivax*. CSP a été considéré comme un candidat vaccin prometteur et dans cette optique, son polymorphisme a été étudié. Dans toutes les espèces plasmodiales, il s'agit d'un gène présent en copie unique. Il est constitué d'un domaine central répété, codant pour un motif répété d'acides aminés, et de deux régions l'entourant conservées. Le domaine central varie en répétitions et longueur.

Deux types principaux de souches ont été décrites, catégories formées selon la nature du motif central répété : GDRAA/DGQPA ou ANGAGNQPG, nommée respectivement VK210 et VK247. Ces deux variants ont une répartition mondiale mais VK210 reste globalement prédominant [173, 176]. En 1993, un nouveau parasite a été identifié par Qari et al [177], nommé *P. vivax-like*, dont le motif était constitué de 11 acides aminés, APGANQ(E/G)GGAA. Cette séquence est similaire à celle de la protéine CSP du parasite simien *P. simiovale*.

IV-2- Apport des marqueurs microsatellites

Les microsatellites sont des séquences simples répétées d'un motif de 1 à 5 paires de bases. La longueur du microsatellite peut varier de 10 à 100 paires de bases. Ils peuvent être classés en trois types : purs, composés ou constitués de séquences interrompues.

- purs : CACACACACACACA
- composés : CACACAGAGAGA
- interrompus : CACACATTTCACATTCACACACA

Les di-, tri- et tétranucléotides sont les séquences les plus utilisées [178]. Des erreurs de glissement durant la réplication de l'ADN sont fréquentes et vont avoir une incidence sur le nombre de répétitions des microsatellites. Le génome de *P. falciparum* riche en AT (environ 80% de la composition en bases de son génome) possède de nombreux microsatellite de type di-nucléotides (AT)_n ou (TA)_n. Le génome de *P. vivax* est plus riche en GC (environ 55% de AT).

Une question importante concerne la relation entre le type de microsatellite, son nombre de répétitions, et son polymorphisme attendu.

IV-2-a- Microsatellites et *P. vivax*

Des travaux contradictoires ont récemment été publiés sur les microsatellites présents dans le génome de *P. vivax*. Dans une étude publiée en 2004, Leclerc et al [179], ont étudié le

polymorphisme de 13 microsatellites différents sur un total de 108 isolats en provenance d'Asie, Afrique et Amérique du sud. La faible diversité observée (69% des marqueurs étaient monomorphiques) faisait conclure les auteurs à une évolution récente des souches de *P. vivax*. Cette conclusion était soutenue par les travaux de Lim et al [180], ayant de leur côté aussi, par séquençage du gène *pvcsp*, observé une faible diversité génétique des souches de *P. vivax*, suggérant une expansion récente de ce parasite.

Au contraire, plusieurs études ont mis en évidence une importante diversité génétique de *P. vivax*, notamment Imwong et al en 2006 [181]. Sur 11 marqueurs di-nucléotidiques, tous étaient polymorphiques avec 7 à 18 allèles par locus. Les isolats provenaient de Thaïlande, Colombie et Inde. L'hétérozygotie moyenne dans chaque pays était de : 0,77 en Thaïlande, 0,76 en Inde et 0,68 en Colombie.

Pour expliquer ces différents résultats, une hypothèse concernant la longueur des répétitions a été émise : les erreurs lors de la réplication de l'ADN augmentent de façon exponentielle avec la taille des séquences répétées. Dans l'étude de Leclerc et al, le nombre de répétitions était de 5,5 en moyenne, et dans celle de Imwong et al, de 16. Karunaweera et al, 2008 [182] ont sélectionné 14 nouveaux marqueurs formés de motifs de type tri- ou tétranucléotides. L'hétérozygotie variait de 0,657 à 0,908 sur un total de 50 isolats provenant du Sri Lanka. Après extension de l'analyse à 164 isolats provenant de tous les continents (et identification de 150 haplotypes), aucun regroupement n'était possible par région géographique : la distance génétique dans les populations parasitaires était semblable au niveau d'un continent et entre les continents.

L'utilisation des marqueurs microsatellites pour explorer l'évolution phylogénétique de *P. vivax* doit être considérée avec précaution; les microsatellites sont fortement soumis au phénomène d'homoplasie, à savoir que des souches présentant le même profil microsatellite peuvent avoir évolué différemment ce qui contribue à une sous-estimation de la divergence des souches. Ils prennent en revanche toute leur importance dans les études de génétique des populations à un niveau plus local, et également pour différencier les recrudescences des reviviscences ou nouvelles infections pour l'interprétation des tests d'efficacité thérapeutique *in vivo* [183].

La résistance aux antipaludiques résulte de mutations ou de la duplication de gènes, indépendamment de la pression due à un antipaludique, mais ces mutants sont ensuite sélectionnés du fait de cette pression de sélection, et vont diffuser. Il y a donc 2 phases pour l'émergence de clones résistants : l'acquisition spontanée d'une mutation et sa propagation.

Ces mutations vont se produire au niveau du cycle érythrocytaire asexué, mais des recombinaisons peuvent prendre place par la suite de la méiose chez le moustique. L'étude de marqueurs microsatellites dans des régions proches des gènes associés à la résistance va constituer un marqueur neutre de l'apparition et de la diffusion de ces mutations.

IV-2-b- Utilisation des marqueurs microsatellites pour comprendre la diffusion de la résistance de P. falciparum à la SP

Un individu infecté par *P. falciparum* est porteur en moyenne de 10^{10} à 10^{12} parasites, et il a été estimé que la fréquence d'apparition des mutations est de 2.5×10^{-9} à 3×10^{-11} par réplication parasitaire en laboratoire [184]. Dans ce cas, la sélection de clones mutants pourrait se produire indépendamment chez différents patients infectés et ces clones présenteraient des profils différents au niveau des marqueurs microsatellites situés à proximité des gènes de résistance.

La résistance de *P. falciparum* à la SP est apparue et s'est propagée rapidement après l'introduction de cet antipaludique. On a ainsi pensé que la résistance avait émergé de plusieurs foyers géographiques. Le polymorphisme des marqueurs microsatellites a été étudié à partir d'isolats provenant d'Asie du sud et porteurs de 2 à 4 mutations sur le gène *dhfr*, ces mutations ayant été corrélées à la résistance à la SP. La diversité génétique des isolats était réduite dans une région de 100 kb autour du gène *dhfr*, et plus particulièrement de 58 kb en amont du gène, et de 40 kb en aval [185]. 33 marqueurs microsatellites ont été étudiés. L'hétérozygotie de 6 marqueurs (les plus proches du gène *dhfr*, 12kb) était significativement plus faible sur des clones mutés que sauvages sur le gène *dhfr*. Cela montre que les mutations sont apparues sur une même lignée de parasites. Il est possible que la mutation en 108 se soit produite plusieurs fois, mais que l'acquisition des mutations ultérieurement (51, 59 et 164) ait réduit le nombre de clones portant ces génotypes.

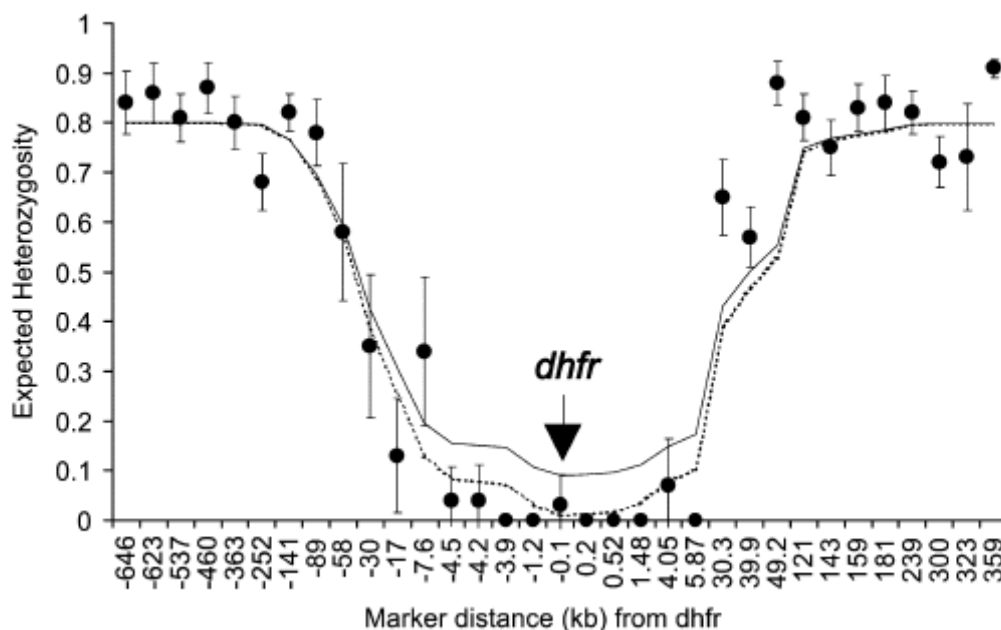


Figure 6. Hétérozygotie moyenne attendue des marqueurs microsatellites en fonction de leur distance au gène *dhfr*.

D'après Nair et al, 2003 [185]

Une autre étude [186] réalisée à partir d'isolats provenant de 11 pays d'Afrique subsaharienne et portant sur des isolats sauvages ou triples mutés (N51I + C59R + S108N) sur le gène *dhfr* a mis en évidence le même phénomène, à savoir que 85% des isolats triples mutés présentait le même haplotype au niveau des marqueurs microsatellites étudiés (4 marqueurs, di-nucléotides, situés à -3,87 / -0,1 / +0,52 et +1,48 kb du gène *dhfr*).

Enfin, le génotypage de 8 marqueurs microsatellites sur des isolats provenant d'Afrique et d'Asie du sud est a montré une origine commune de l'allèle triple muté identifié en Afrique avec les isolats porteurs de 2 à 4 mutations identifiés en Asie [187].

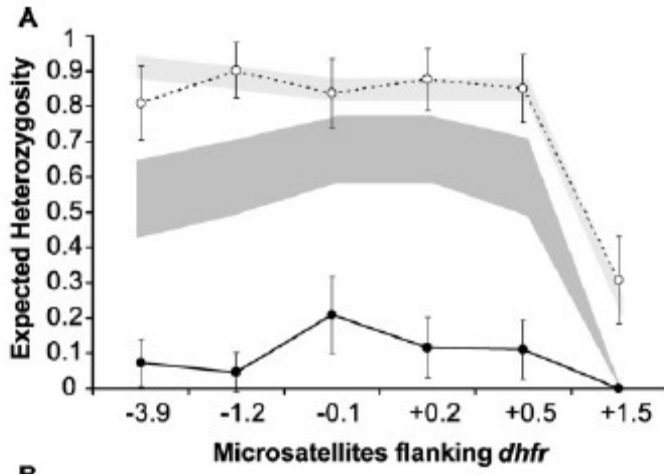


Figure 7. Réduction de la diversité génétique sur les souches mutées sur le gène *dhfr*.

D'après Nair et al, 2003 [185]

IV-2-c- Peu de données concernant *P. vivax*

Peu d'informations sont disponibles pour comprendre l'origine et la dissémination des souches de *P. vivax* résistantes aux antipaludiques. Deux études ont été publiées sur la diversité génétique de microsatellites à proximité du gène *pvdhfr* ou des séquences situées en amont et en aval du gène. 4 marqueurs di-nucléotidiques ont été étudiés par Alam et al, 2007 [188] : le nombre d'allèles observés dans une population de 110 isolats collectés en Inde variait de 4 à 10, avec une hétérozygotie attendue de 0,50 à 0,82. Aucune association n'a été retrouvée entre l'haplotype identifié par les microsatellites et le profil muté ou sauvage sur le gène *dhfr*.

Hawkins et al, 2008 [189] ont mis en évidence une forte diversité génétique des isolats de *P. vivax* au niveau des régions entourant le gène *dhfr* et des marqueurs microsatellites. Trois types de souches différents portant un génotype quadruple muté sur le gène *dhfr* (57I/58R/61M/117T) impliqué dans les échecs thérapeutiques *in vivo* ont été identifiés. Ces souches étaient originaires de Thaïlande, Indonésie, et Papouasie Nouvelle Guinée / Vanuatu. Il semblerait que l'émergence de souches triples ou quadruple mutées sur le gène *dhfr* chez *P. vivax* soit plus probable que chez *P. falciparum*, augmentant les risques de diffusion de la résistance.

V- Madagascar et le paludisme

V-1- Données géographiques et historiques

Avec 1500 km de longueur sur près de 570 km dans sa plus grande largeur, Madagascar se place comme la quatrième plus grande île du monde. Du nord au sud et d'est en ouest, elle recèle une grande diversité des milieux naturels : forêts tropicales humides (nord-est), fourrés épineux arides (sud-ouest)... Le climat et le relief influencent considérablement le rythme et l'intensité de la transmission du paludisme. Quatre faciès sont distingués :

- le faciès équatorial (sur la côte orientale et l'extrême nord)
- le faciès tropical (sur la côte occidentale, au nord de Morondava)
- le faciès des Plateaux (similaire au faciès austral africain)
- le faciès du sud (semi-aride)

(Figure 8)

Il en découle deux types de zones à transmission palustre: les zones à risque épidémiques et les zones endémiques (Atlas du paludisme, 2002, www.pasteur.mg).

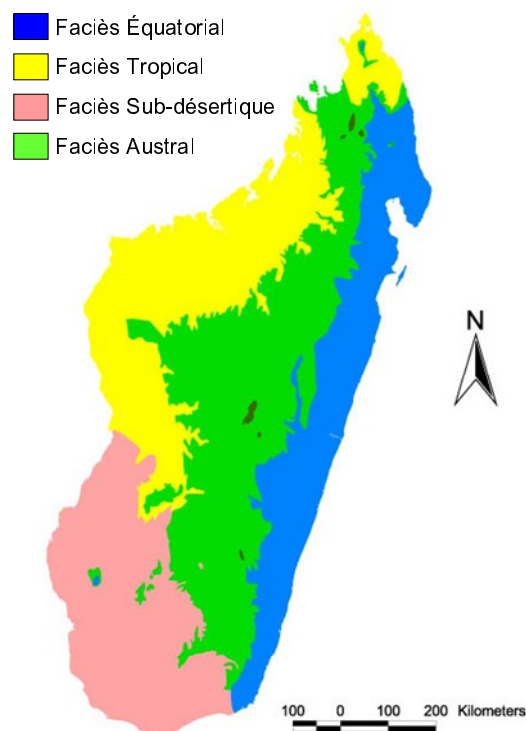


Figure 8. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar.

D'après les légendes locales, le paludisme semble avoir existé à Madagascar depuis l'origine de son peuplement. L'insalubrité des côtes malgaches fut décrite par les migrants et colons arrivés sur l'île depuis le XVI^{ème} siècle qui soulignaient par ailleurs l'absence de ces fièvres sur les hautes terres centrales. Plusieurs épidémies ont cependant eu lieu : en 1878, 1895... conséquences de migration de populations des côtes vers les hauts plateaux et du développement d'une riziculture foyer de pullulation des espèces anophèles vecteur de paludisme. Des campagnes d'éradication (pulvérisations intra domiciliaires de DDT et chimioprophylaxie des enfants par la chloroquine) firent reculer le paludisme dans le courant du XX^{ème} siècle ; mais la pauvreté, une crise économique et l'inefficacité des systèmes de santé provoquèrent l'arrivée de nouvelles épidémies lourdes de victimes dans les années 80 [6].

V-2- Les vecteurs du paludisme

Quatre espèces d'Anophèles se partagent l'entomologie du paludisme à Madagascar. Il s'agit, d'une part, d'espèces du complexe *An. gambiae* (*An. gambiae*, *An. arabiensis*, et *An. mascarensis*, espèce endémique), et d'autre part, d'*An. funestus*. *An. funestus* est essentiellement retrouvée sur les plateaux, 90% de ses gîtes larvaires sont constitués par les rizières [190]. *An. arabiensis* a été retrouvée mais de façon minoritaire sur les plateaux [191]. *An. gambiae* et *An. arabiensis* se partagent les zones côtières de Madagascar, avec des proportions variables mais les études restent également parcellaires ; *An. gambiae* domine toutefois dans le nord et l'est, tandis que *An. arabiensis* est plus présente dans l'ouest et le sud. Une dernière espèce (*An. merus*) est également retrouvée dans une région particulière (l'Androy). Dans leur étude publiée en 2004, Robert et al [192] ont montré une tendance à l'exophilie du principal vecteur (*An. funestus*) présent sur le site d'étude choisi (Analamiranga, un village situé à l'ouest des hauts plateaux). La capacité vectorielle du moustique était faible et sur seulement neuf moustiques du *Plasmodium* a été isolé (pas de *P. malariae*).

V-3- Les espèces plasmodiales présentes

Quatre des cinq espèces de paludisme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) responsables de l'infection humaine sont donc présentes à Madagascar (*P. knowlesi* n'a jamais encore été recherché). *P. vivax* semble avoir longtemps été l'espèce prédominante (*P. falciparum* n'y ayant fait son apparition qu'à la fin du XIX^{ème} siècle) et des données indiquent qu'avant 1950, les proportions de *P. falciparum* et *P. vivax* étaient identiques sur les hauts Plateaux (10). Néanmoins, *P. vivax* aurait nettement reculé depuis les campagnes d'éradication du paludisme menées après 1950 et ne représenterait sur les Plateaux que 20% des infections palustres (données de 1993 [193]), voire 10% actuellement. Une étude publiée en 2000 à partir d'isolats collectés en 1997 [194] donnait de premiers résultats mais trop parcellaires pour estimer la prévalence relative des espèces de *Plasmodium*, l'objectif de l'étude étant d'évaluer la chimiorésistance de *P. falciparum* sur la côte est de Madagascar (Tableau 5).

Tableau 5. Prévalence des espèces plasmodiales sur 4 sites de Madagascar.

Espèce	Site			
	Marovay	Nosy Be	Sainte Marie	Toamasina
<i>P. falciparum</i>	70.7%	79.5%	92.2%	97.6%
<i>P. vivax</i>	1.7%	0%	0%	2.4%
<i>P. ovale</i>	0.4%	6.3%	0.4%	0%
<i>P. malariae</i>	27.2%	14.2%	7.4%	0%

Plus récemment, une seconde étude [161] impliquant les sites d'étude du réseau de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium* à Madagascar, permettait d'estimer la l'importance de *P. vivax* dans les infections palustres (Tableau 6).

Tableau 6. Prévalence des espèces plasmodiales sur 3 régions de Madagascar.

Espèce	Région			
	Est	Ouest	Centrale	Total
<i>P. falciparum</i>	97.3%	94.5%	95.9%	96.4%
<i>P. vivax</i>	1.5%	2.2%	2.7%	2.1%
<i>P. ovale</i>	0.4%	0%	0.9%	0.5%
<i>P. malariae</i>	0.8%	3.3%	0.5%	1.0%

V-4- Résistance des parasites aux antipaludiques

Jusqu'en 2005, la chloroquine a constitué le traitement de première intention des cas de paludisme simples quelque soit l'espèce plasmodiale en cause. Elle était également préconisée dans la chimioprophylaxie de la femme enceinte [195]. La SP été recommandée comme traitement de deuxième intention (dans le cas de résistances à la chloroquine) entre 1998 et 2005. Elle est maintenant recommandée dans le traitement préventif intermittent de la femme enceinte.

Depuis 2005, Madagascar, comme la vaste majorité des pays situés en zone d'endémie palustre, a changé sa politique nationale de traitement, en abandonnant la chloroquine au profit des ACT (artémisinine combined therapy), médicaments combinant un dérivé de l'artémisinine et une autre molécule ; à Madagascar, il s'agit de l'amodiaquine. Néanmoins, l'utilisation de la chloroquine reste recommandée par le Ministère de la Santé et du Planning Familial de Madagascar pour la prise en charge à domicile des cas de paludisme suspectés (sur la présence de fièvre) chez l'enfant de moins de 5 ans. De plus, à la fin de l'année 2007, 31 districts sur les 111 que compte Madagascar avaient à leur disposition des ACT. Dans un questionnaire adressé aux patients lors de leur inclusion dans les tests *in vivo*, il ressortait que 67,6% des patients reconnaissaient avoir pris de la chloroquine en auto-médication. La chloroquine reste donc encore largement utilisée.

La résistance aux antipaludiques reste encore modérée à Madagascar excepté pour la chloroquine [196]. Au niveau national, 44% des patients infectés par *P. falciparum* et traités à la chloroquine ont subi un échec thérapeutique (évaluation à 28 jours et correction par PCR). Les mécanismes liés à cette résistance ne sont pas clairs ; la mutation N86Y a été retrouvée

sur le gène *pfmdr1*, mais la mutation K76T dont le rôle a été clairement démontré dans la résistance des isolats de *P. falciparum* à la chloroquine n'a été identifiée que sur quelques isolats [197]. Une étude ayant porté sur 16 patients infectés par *P. malariae* a montré la persistance de la sensibilité de ce parasite à la chloroquine (Annexe 4) [198].

Le paludisme à *P. vivax* est souvent considéré comme une maladie bénigne mais ceci devrait être reconsidéré au vu des connaissances récemment acquises sur cette maladie. Les symptômes parfois sévères [199], l'importance des zones de transmission [39], les récentes difficultés thérapeutiques et le potentiel évolutif de ce parasite sont des arguments en faveur d'une revalorisation de sa place dans l'échelle des pathogènes dangereux pour l'homme. Ainsi, ce parasite présente des caractéristiques de transmission qui pourraient lui donner un intérêt nouveau dans un contexte de modifications climatiques et de migration de populations [200].

Objectifs

Afin d'améliorer notre connaissance concernant le paludisme à *Plasmodium vivax* à Madagascar, notre travail avait pour principaux objectifs :

- D'une part d'estimer le poids du paludisme à *Plasmodium vivax* en mesurant sa prévalence parmi les sujets suspects de paludisme au niveau des centres de santé (Article N°1);
- D'autre part, d'évaluer la sensibilité de ce parasite aux principaux antipaludiques encore utilisée, à savoir la chloroquine (Article N°2, Partie 3) et l'association sulfadoxine-pyriméthamine (Article N°1). Pour cela, nous avons utilisés plusieurs approches complémentaires : les tests d'efficacité thérapeutique selon les protocoles établis par l'OMS pour *P. vivax*, ainsi que la recherche de marqueurs moléculaires. Une partie de notre travail a également consisté à mettre au point un test *in vitro* à partir des isolats recueillis sur le terrain. Le but était de disposer des 3 méthodes afin d'observer les informations apportées par chacune.
- Enfin, afin d'améliorer la surveillance de la résistance par la mise en place de sites sentinelles, nous avons choisi d'évaluer la diversité génétique de nos souches en utilisant les marqueurs les protéines de surface parasitaires (*csp*, *msp3*, *msp1*) et différents marqueurs microsatellites (Parties N°2 et 4).

Résultats

Partie 1 : Estimation de la prévalence des infections palustres causées par *P. vivax*, sensibilité de ce parasite à la SP et prévalence des mutations impliquées dans la résistance à cet antipaludique

Les objectifs de ce travail ont été de rechercher la présence de marqueurs moléculaires de la résistance à la SP sur les isolats collectés sur 8 sites sentinelles de Madagascar et de rechercher une corrélation entre la présence de ces marqueurs et la survenue d'échecs thérapeutiques *in vivo*.

La chloroquine a été largement utilisée à Madagascar depuis les années 50, dans toutes les grandes campagnes pour faire reculer le paludisme, et plus tard, elle a été recommandée comme traitement de première intention du paludisme simple à *P. falciparum*. La sulfadoxine-pyriméthamine a été le traitement de 2^{ème} intention de 1998 à 2005. Elle est maintenant recommandée dans le traitement préventif intermittent de la femme enceinte, et des études sont en cours pour étendre son utilisation au traitement préventif intermittent chez l'enfant.

Nous avons collectés les isolats de *P. vivax* chez des patients venant consulter pour fièvre et suspicion de paludisme. Sur ces isolats, nous avons amplifié et séquencé les gènes *dhfr* et *dhps*, impliqués dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine. De plus, un test d'efficacité thérapeutique a été conduit sur le site de Tsiroanomandidy permettant d'inclure 16 patients.

Nous avons observé une grande proportion d'isolats mutés sur le gène *dhfr* (71%, total de 159) comprenant des génotypes simple à triple mutés. De nouvelles mutations ont été identifiées au niveau des codons 21 et 130 (P21S et N130K). Le taux de parasites mutés était plus faible sur le gène *dhps* (16%), et seules deux mutations ont été identifiées. Sur les 16 patients inclus dans le protocole *in vivo*, 3 ont subi un échec thérapeutique (taux ajusté après génotypage des souches). Ces 3 patients étaient infectés par des isolats double mutés sur le gène *dhfr*, mais nous n'avons pas mis en évidence de lien entre la présence de mutations et la survenue d'un échec thérapeutique.

Ces résultats concordent cependant avec ceux disponibles dans la littérature. Nous savons que les mutations confèrent un degré de résistance aux isolats qui les portent sur le gène *dhfr*. Cependant, il faut souvent 4 mutations pour avoir une corrélation entre le génotype

et la survenue de l'échec thérapeutique. D'autres facteurs interviennent, à savoir l'immunité de l'hôte, son métabolisme, son état de malnutrition.

La SP étant recommandée dans le TPI, son utilisation à grande échelle va contribuer à sélectionner de nouveaux parasites résistants. Il sera donc indispensable de continuer à surveiller l'évolution de la résistance, notamment par l'utilisation des marqueurs moléculaires disponibles sur les gènes *dhfr* et *dhps*.

Research

Open Access

***Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-pyrimethamine**

Céline Barnadas*¹, Magali Tichit⁴, Christiane Bouchier⁴,
Arsène Ratsimbaoa², Laurence Randrianasolo², Rogelin Raherinjafy³,
Martial Jahevitra³, Stéphane Picot¹ and Didier Ménard³

Address: ¹EA4170, Parasitology and Tropical Medicine, University Lyon 1, Lyon, France, ²Epidemiology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar, ³Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar and ⁴Plate-forme Génomique, Institut Pasteur de Paris, Paris, France

Email: Céline Barnadas* - cbarnadas@free.fr; Magali Tichit - mtichit@pasteur.fr; Christiane Bouchier - bouchier@pasteur.fr; Arsène Ratsimbaoa - arsene@pasteur.mg; Laurence Randrianasolo - laurence@pasteur.mg; Rogelin Raherinjafy - raherinjafy@yahoo.fr; Martial Jahevitra - mjahevitra@yahoo.fr; Stéphane Picot - Stephane.Picot@sante.univ-lyon1.fr; Didier Ménard - dmenard@pasteur.mg

* Corresponding author

Published: 26 February 2008

Received: 24 September 2007

Malaria Journal 2008, **7**:35 doi:10.1186/1475-2875-7-35

Accepted: 26 February 2008

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/7/1/35>

© 2008 Barnadas et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Four of five *Plasmodium* species infecting humans are present in Madagascar. *Plasmodium vivax* remains the second most prevalent species, but is understudied. No data is available on its susceptibility to sulphadoxine-pyrimethamine, the drug recommended for intermittent preventive treatment during pregnancy. In this study, the prevalence of *P. vivax* infection and the polymorphisms in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes were investigated. The correlation between these polymorphisms and clinical and parasitological responses was also investigated in *P. vivax*-infected patients.

Methods: *Plasmodium vivax* clinical isolates were collected in eight sentinel sites from the four major epidemiological areas for malaria across Madagascar in 2006/2007. *Pvdhfr* and *pvdhps* genes were sequenced for polymorphism analysis. The therapeutic efficacy of SP in *P. vivax* infections was assessed in Tsiroanomandidy, in the foothill of the central highlands. An intention-to-treat analysis of treatment outcome was carried out.

Results: A total of 159 *P. vivax* samples were sequenced in the *pvdhfr/pvdhps* genes. Mutant-types in *pvdhfr* gene were found in 71% of samples, and in *pvdhps* gene in 16% of samples. Six non-synonymous mutations were identified in *pvdhfr*, including two novel mutations at codons 21 and 130. For *pvdhps*, beside the known mutation at codon 383, a new one was found at codon 422. For the two genes, different combinations were ranged from wild-type to quadruple mutant-type. Among the 16 patients enrolled in the sulphadoxine-pyrimethamine clinical trial (28 days of follow-up) and after adjustment by genotyping, 3 (19%, 95% CI: 5%–43%) of them were classified as treatment failure and were *pvdhfr* 58R/117N double mutant carriers with or without the *pvdhps* 383G mutation.

Conclusion: This study highlights (i) that genotyping in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes remains a useful tool to monitor the emergence and the spread of *P. vivax* sulphadoxine-pyrimethamine resistant in order to improve the national antimalarial drug policy, (ii) the issue of using sulphadoxine-pyrimethamine as a monotherapy for intermittent preventive treatment of pregnant women or children.

Background

Plasmodium vivax remains the second most common cause of malaria in the world, infecting more than 80 million people annually. It is the most geographically widespread malaria parasite and it is found throughout South and Central America, Asia, the Middle East and parts of Africa [1].

Malaria is endemic throughout Madagascar, except in highland regions above 1,500 m. *Plasmodium falciparum* is the dominant malaria species, but *P. vivax* and *Plasmodium malariae* have an increased prevalence in the foothills of the central highlands [2,3]. With over one million suspected cases reported in 2005, malaria remains one of the leading cause of morbidity and mortality in the country [4-6]. Although *P. vivax* causes less mortality than *P. falciparum*, it is responsible for significant morbidity and economic loss.

For the past 50 years, chloroquine was used as the first line treatment for malaria in Madagascar, with SP the second line treatment choice. In 2005, the National Malaria Control Programme (NMCP) decided to revise its treatment policy, replacing CQ by artemisinin-based combination therapy (AQ+AS, a combination of artesunate plus amodiaquine) and recommending SP for intermittent preventive treatment for pregnant women (IPTp) [7]. Some studies *in vivo* [8] and *in vitro* [9-11] have investigated the susceptibility of *P. falciparum* to this drug, but no data concerning the susceptibility of *P. vivax* to SP is available. Molecular and epidemiological studies have clearly shown that, as for *P. falciparum*, the major mechanism of resistance to SP involves specific point mutations in the *dhfr* (dihydrofolate reductase) and *dhps* (dihydropteroate synthase) genes of the parasite. In total, 20 non-synonymous mutations have already been described in the *pvdhfr* gene [12]. Some of these mutations (at codons 57, 58, 61, 117 and 173) are involved in resistance to pyrimethamine [12]. Five mutations have already been identified in the *pvdhps* gene, at codons 382, 383, 512, 553 and 585, corresponding to positions 436, 437, 540, 581 and 613 of the homologous gene in *P. falciparum*. No data is available about polymorphism in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes of malaria parasites from Madagascar. Only one *pvdhfr* gene mutation, at codon 33, has been identified in some isolates (four of nine from Madagascar and the Comoro Islands), but this mutation has not been reported to be associated with clinical resistance or resistance *in vitro* [13,14].

Since, it is difficult to monitor the susceptibility of *P. vivax* to antimalarial drugs by *in vitro* tests [15], molecular markers of drug resistance are useful tools for mapping the current and changing pattern of SP-resistant *P. vivax* isolates. The aims of this study were: (i) to assess polymor-

phisms in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes, using 159 *P. vivax* samples, and (ii) to correlate *pvdhfr/pvdhps* patterns with clinical and parasitological responses in *P. vivax*-infected patients.

Methods

Collection of clinical isolates of *P. vivax*

Plasmodium vivax clinical isolates were collected in 2006/2007 from individuals seeking treatment for malaria at government health facilities located in areas corresponding to the four epidemiological strata for malaria across Madagascar: Ejeda and Ihozy in the South (epidemic-prone area), Tsiroanomandidy and Moramanga/Saharevo in the foothills of the Central Highlands (low-level endemic area), Maevatanana and Miandrivazo in the West (seasonal and endemic area) and Farafangana and Andapa in the East (periannual endemic area). All patients with fever or a history of fever in the 48 h before their arrival at the health centre were screened with the rapid diagnostic test (RDT), which is based on the detection of *Plasmodium*-specific lactate dehydrogenase (pLDH) (OptiMAL-IT™, DiaMed AG®, Cressier sur Morat, Switzerland). Giemsa-stained thin and thick blood films were prepared for each patient with a positive RDT result. The various species of *Plasmodium* were identified and parasitaemia was assessed by a skilled microscopist. Once informed consent had been obtained from all adults and from at least one parent for minors, blood was collected on filter paper. Patients with positive microscopy results were promptly treated according to National Malaria Policy.

SP efficacy

The therapeutic efficacy of the sulphadoxine-pyrimethamine was assessed in *P. vivax* infections in 2006 in Tsiroanomandidy. The clinical protocol was reviewed and approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health and Family Planning of Madagascar (N° 102-SANPF-2006). Patients with blood smear confirmed *P. vivax* infection were enrolled based on the inclusion criteria given in WHO guidelines (2001) [16]. Informed consent was obtained from all adults and from at least one parent for minors and patients were treated with the standard SP regimen (25 mg/kg sulphadoxine and 1.25 mg/kg pyrimethamine as a single dose on day 0) and followed for 28 days. Each patient was weighed and medical history (including previous antimalarial medication) was recorded. Clinical examination, including axillary temperature recording, staining of serial thick and thin films, was performed on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, and 28. Giemsa-stained thick and thin films were read by a skilled microscopist. Asexual- and sexual-stage parasites were counted, and counts expressed per 200 white blood cells. Parasitaemia was calculated on the basis of a white blood cell count of 8,000/ μ l. Thick-film examinations were considered to

be negative if no parasite was found in 100× high-power fields. Blood was blotted onto filter paper at various time-points during follow-up and stored at 4°C for DNA extraction. Haemoglobin concentration was measured on days 0 and 28 (HemoCue®, Anglholm, Sweden).

The primary end point was therapeutic response, based on parasitological and clinical cure by day 28, according to the 2001 WHO protocol [16]. Therapeutic response was classified as "treatment failure" (TF; clinical deterioration due to *P. vivax* illness requiring hospitalization, with parasitaemia and axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$ any time between days 3 and 28, or parasitaemia on any day between days 7 and 28, regardless of clinical conditions) or "adequate clinical and parasitological response" (ACPR; absence of parasitaemia on day 28 without the criteria for TF previously being met). Patients with treatment failure were treated with artesunate (4 mg/kg on days 0, 1, and 2) plus amodiaquine (10 mg/kg on days 0, 1, and 2); however, their response to repeat therapy was not assessed.

Molecular genotyping techniques were used to distinguish recrudescences from reinfections for patients with treatment failure after day 7. Briefly, blood samples collected on the day of enrolment, on day 1 and on the day of treatment failure were analysed by sequencing for polymorphisms in the genes for circumsporozoite protein (*pvcs*) [17] and merozoite surface protein-3 (*pvm*) [18] and for six different microsatellite markers [19,20] (Table 1). Microsatellite PCR products were size-genotyped by using a standard-size Genescan 500 LIZ on an ABI Prism 3730XL. The genotyping patterns on the day of failure were compared with those at treatment initiation and on day 1. An outcome was defined as recrudescence if

all alleles present at the time of failure were present at the time of treatment initiation or on day 1, and defined as a reinfection otherwise.

The secondary end points were (i) fever clearance time, defined as the time (days) from initiation of treatment to the end of fever (i.e., patient remaining afebrile, based on reported history, with an axillary temperature of $<37.5^\circ\text{C}$ on a given day of follow-up); (ii) parasite clearance time, defined as the time (days) from the initiation of treatment to parasite clearance (defined as the moment when parasite counts fell below the detection threshold for microscopy) and (iii) haematological recovery, defined as being cured on day 28, with a haemoglobin level greater than that on day 0.

DNA extraction, *pvdhfr/pvdhps* amplification and sequencing

DNA was extracted from blood spots with Instagene® Matrix resin (BioRad®, Marnes la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. Parasite species were confirmed by real-time PCR, using species-specific primers previously described by de Monbrison [21], with a protocol adapted for the RotorGene® 3000 thermocycler (Corbett Life Science®, Sydney, Australia).

Plasmodium vivax isolates were genotyped for the *pvdhfr* and *pvdhps* genes. DNA was amplified by semi-nested PCR for *pvdhfr* gene amplification or by nested PCR for *pvdhps*, using gene-specific primers [22,23]. PCR products were purified, using polyacrylamide P-100 Gel (Bio-Gel P-100, BioRad®, Marnes-la-Coquette, France), by 96-well plate filtration (Millipore®, St. Quentin en Yvelines, France). Sequencing reactions were performed using ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing ready reactions kit

Table 1: Primer sequences of the microsatellite markers used for differentiating recrudescences from reinfections in paired samples from enrolled patients with treatment failure after day 7.

Micro satellite markers	Motif	External PCR	Internal PCR	Label
14.185§	AT	F: TGCAGATATGCTGTGCGAAT R: GGGAAAACTTGGTCACAC	F: GCAGTTGTTGCAGATTGAGC R: TAAGGCGTGCACGTTATCAT	6FAM
8.332§	AT	F: TGAAGCAATATAGCGATGAC R: CGGTGTAGTGTGGTACAATG	F: CCTCGATGGTGATGTGATGA R: GTATAACATGGCACCCGACCT	HEX
6.34§	AC	F: CCCAATTAAGTGCAAATCA R: CATGTAAAGAGGCACATGG	F: TGAGCGCTTTAAGCTTCTGC R: CAAAAATGAATCGTGGCACA	6FAM
2.21§	AC	F: GGCAGGAACGTAGAGGAG R: GGCTTGTTTCATTTGAGGTA	F: CCATCTGCTCAAATCCGAAG R: GGCTCCTCCCTGTCTCTGTAG	6FAM
AY391734#	CA	F: TACCCCAGCCTTATCTCTC R: AAATGCACAGACACTACGC	F: TTTTCCCTTCGAAAAACG R: ACGACCATCACCTGCCATAG	6FAM
AY391740#	AC	F: ATTTGTGTATGCCCTTGTT R: GTGAGGGTGTCTATCCGTA	F: GTTTACCAGGCCCAATTAC R: GTTCACACGGCGTATACAT	HEX

§ microsatellites sequences described by Imwong et al, 2006 [20]

microsatellites sequences described by Leclerc et al, 2004 [19]

Primers sequences were designed by primer3 software [39]

F: forward primer

R: reverse primer

and run on a 3730 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Electrophoregrams were visualized and analysed with CEQ™ 2000 Genetic Analysis System software (Beckman Coulter™). Amino-acid sequences were compared with wild-type sequences (GenBank accession no. [X98123](#) for *pvdhfr* and Genbank accession no. [AY186730](#) for *pvdhps*), using BioEdit Sequence Alignment Editor software [24]. Parasites with mixed alleles (both wild-type and mutant alleles present) were considered to be mutant. A second PCR product was sequenced for confirmation if a new point mutation was observed.

Nucleotide sequence accession number

The complete sequences of the alleles identified has been submitted to GenBank and assigned accession numbers [EU168419](#) to [EU168431](#) for *pvdhfr* and [EU176992](#) to [EU177003](#) for *pvdhps*.

Statistical analysis

Data were input into EpiInfo 6.04® software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States), checked and analysed, using MedCalc® software version 9.1.0.1 (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium) and Comprehensive meta-analysis software version 2 (Biostat, Englewood, NJ 07631, USA).

An intention-to-treat analysis of treatment outcome was carried out. Frequencies were compared using chi-squared tests, and continuous variables were compared using Student's t-tests or Mann-Whitney U-tests, as appropriate. All reported p-values are for two-tailed tests and were considered statistically significant if less than 0.05.

Results

Prevalence of *P. vivax* infections

From January to October 2006 and March to July 2007, 8,363 patients were screened by using RDT. Among these patients, the global prevalence of *P. vivax* infections was estimated at 6.3% (135 cases) of all malaria infections by microscopy. Considerable heterogeneity was observed between the different study areas and prevalence ranged from zero in Andapa to 17.5% in Tsiroanomandidy (Figure 1).

Analysis of the *pvdhfr* and *pvdhps* genes

159 *P. vivax* samples, corresponding to the 135 cases completed with 24 collected in the same conditions, were sequenced on *pvdhfr/pvdhps* genes (Figure 1). A large proportion of these samples (71%, 113/159) had at least one mutation on the *pvdhfr* gene; this proportion ranged from 18% in Ejeda (2/11) to 100% in Ihosy and Farafangana (1/1). These samples displayed non-synonymous mutations at six residues, including four mutations known to be responsible for pyrimethamine resistance (P33L,

C49R, S58R and S117N) and two previously unknown mutations (P21S and N130K). The most prevalent mutant-type alleles were S58R (58%) and S117N (63.5%), particularly for study sites on the western side of Madagascar. The mutant P33L allele, which has been reported to be specific to Madagascar, was found in only 6% of isolates and was not restricted to any particular area. The fourth mutation, C49R, was present in 3% of the isolates and was limited to Maevatanana. The two new non-synonymous mutations, P21S and N130K, were identified in two and 50 isolates, respectively, at only two sites (Miandrivazo and Tsiroanomandidy). An additional synonymous mutation was detected at amino-acid 15 (gca → gcg) in 69 samples (43%). No variation in the number of repeats was observed in the polymorphic region between nucleotides 262 and 309 [25].

Non-synonymous mutations were found at two residues of the *pvdhps* gene, in 25 of the 159 isolates: 24 samples (15%) displayed the A383G mutant allele and one sample (0.6%) the C422R mutant allele. No mutant alleles were found at southern sites and such alleles were surprisingly rare in Miandrivazo (3%), despite 83% of the isolates from this site having mutant alleles of the *pvdhfr* gene. Based on the *pvdhps* tandem repeat region located between amino-acid residues 603 to 658 of the reference sequence, nine different genotypes, including the reference genotype, were identified. All the A383G mutant-type isolates were from the same genotype. These changes and the corresponding positions of mutations in *pvdhfr* and *pvdhps* are shown in Table 2.

In total, 15 different genotypes were identified, as presented in Table 3, including wild-type and single, double or triple mutant-types in for *pvdhfr* and the wild-type or single mutants for *pvdhps*. Only 27.7% of the 159 isolates sequenced were wild-type for both genes, and all but two of the parasites with mutant genotypes for *pvdhps* (98.7%) also had mutant genotypes for *pvdhfr*. Four single mutant allele genotypes were observed for *pvdhfr*, but none of these genotypes was ever associated with mutation in the *pvdhps* gene. In the double-mutant genotype, the 130K mutation was combined with 33L or 117N mutations in the *pvdhfr* gene, in the absence of mutation in the *pvdhps* gene. The *pvdhfr* 58R/117N double mutant accounted for 25.8% of isolates, 10.1% of which also had the A383G mutation in the *pvdhps* gene. Finally, two triple-mutant *pvdhfr* genotypes were observed, with and without mutations in the *pvdhps* gene. The 49R/58R/117N genotype was found only in Maevatanana, whereas the 58R/117N/130K genotype was found mostly in Miandrivazo and Tsiroanomandidy.

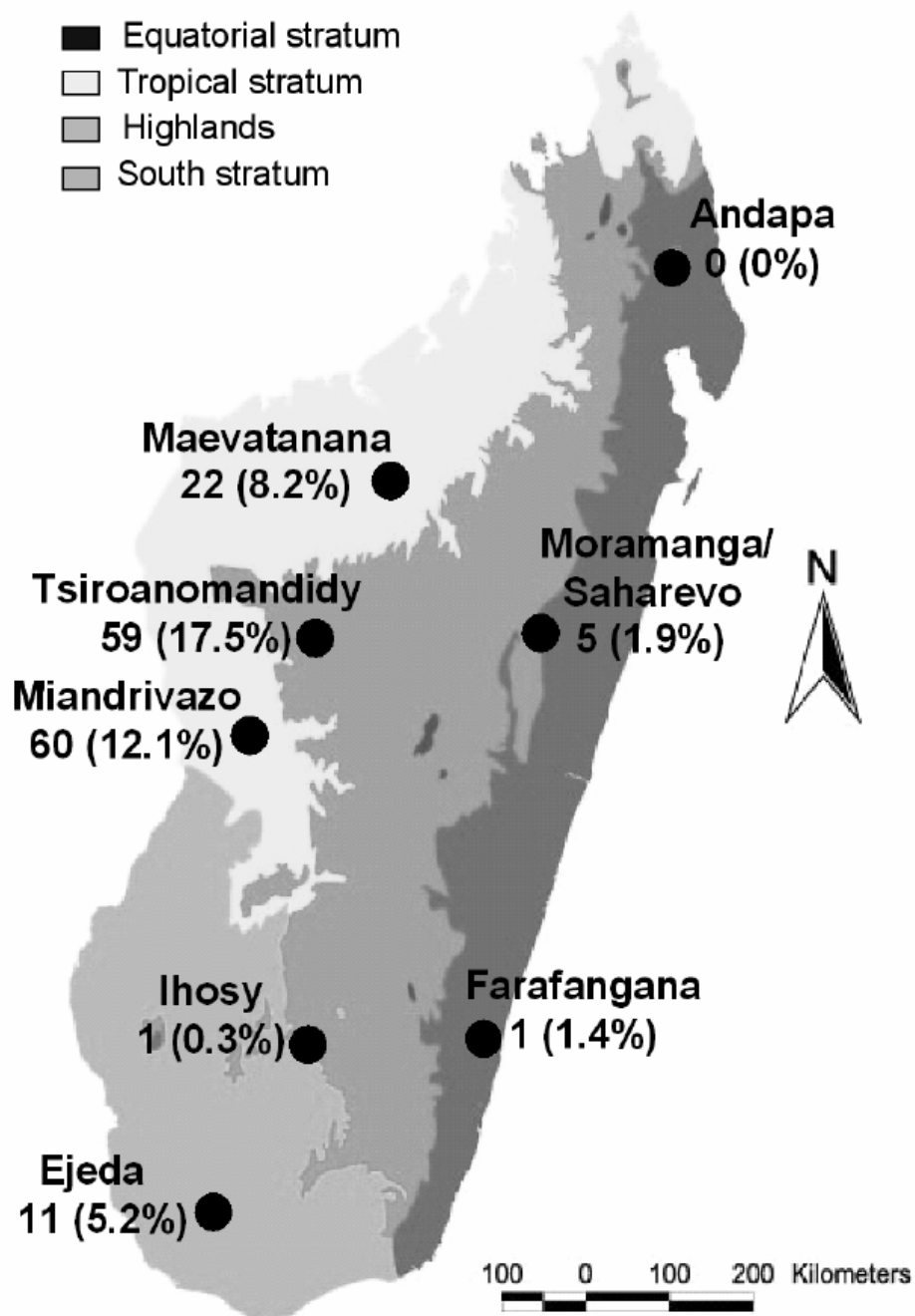


Figure 1
Map of Madagascar showing the distribution of *P. vivax* isolates from each study area.

Table 2: Frequency distribution of mutant-type alleles for DHFR and DHPS domains in 159 Malagasy isolates collected from 7 sites in 2006–2007

Sampling site	No. of isolates	No. of mutant isolates (%)	<i>P. vivax dhfr</i> polymorphism						<i>P. vivax dhps</i> polymorphism			
			Amino-acid residue						No. of mutant isolates (%)	Amino-acid residue		
			P21S	P33L	C49R	S58R	S117N	N130K		A383G	C422R	
South	Ejeda	11	2 (18)	-	1	-	1	1	-	0 (0)	0	0
	Ihoso	1	1 (100)	-	-	-	-	1	-	0 (0)	0	0
West	Miandrivazo	60	50 (83)	1	1	-	43	47	44	2 (3)	1	1
	Maevatanana	22	14 (64)	-	2	5	12	12	-	8 (36)	8	0
Central Highlands	Tdd	59	42 (71)	1	4	-	33	37	6	11 (19)	11	0
	Moramanga	5	3 (60)	-	1	-	2	2	-	3 (60)	3	0
East	Farafangana	1	1 (100)	-	-	-	1	1	-	1 (100)	1	0
Total		159	113 (71)	2 (1.3)	9 (5.7)	5 (3.1)	92 (57.9)	101 (63.5)	50 (31.4)	25 (16)	24 (15)	1 (0.6)

Residues displaying new mutations are indicated in bold typeface
Tdd: Tsiranomandidy

Clinical and parasitological response to SP

Clinical and parasitological monitoring was complete up

to day 28 for 15 of the 16 patients enrolled in the clinical study of SP efficacy. Nine of these 16 patients were male

Table 3: Frequency distribution of *pvdhfr*/*pvdhps* genotypes in 159 Malagasy isolates collected from 7 sites in 2006–2007

<i>dhfr</i> alleles	<i>dhps</i> alleles	Sampling sites							Total isolates (frequency %)
		South		West		Central Highlands		East	
		Ejeda	Ihoso	Maevatanana	Miandrivazo	Tdd	Moramanga	Farafangana	
No mutation	Wild-type	9	-	7	10	17	1	-	44 (27.7)
	383G	-	-	1	-	-	1	-	2 (1.3)
Single mutant	Wild-type	-	-	-	1	1	-	-	2 (1.3)
	33L	1	-	2	-	4	1	-	8 (5.0)
	117N	-	1	-	3	3	-	-	7 (4.4)
	130K	-	-	-	1	-	-	-	1 (0.6)
Double mutant	Wild-type	-	-	-	1	-	-	-	1 (0.6)
	33L + 130K	-	-	-	1	1	-	-	2 (1.3)
	117N + 130K	1	-	4	2	18	-	-	25 (15.7)
	58R + 117N	-	-	3	-	10	2	1	16 (10.1)
Triple mutant	Wild-type	-	-	1	-	-	-	-	1 (0.6)
	383G	-	-	4	-	-	-	-	4 (2.5)
	Wild-type	-	-	-	39	4	-	-	43 (27.0)
	422R	-	-	-	1	-	-	-	1 (0.6)
	383G	-	-	-	1	1	-	-	2 (1.3)

and seven were female (43.4%). They were aged from nine months to 42 years (median 7.5 years), and had a median weight of 16.5 kg (range 7.5 to 52.5). Fifteen patients (93.8%) had suffered fever during the 48 hours immediately preceding enrolment and one declared having taken antimalarial drugs (tetracycline). Neither microscopy nor real-time PCR showed mixed infections (*P. vivax* with other species). The geometric mean of asexual parasite count was 3,353 parasites/ μ L (range 500 to 21,500) at baseline. None of the patients had detectable gametocytes on microscopy at day 0 or during follow-up. Mean haemoglobin concentration was 7.5 g/dL on day 0, and the mean increase in haemoglobin concentration observed on day 28 was 1.3 g/dL. Eleven patients successfully cleared *P. vivax* parasitaemia after SP treatment, whereas four patients presented a reoccurrence of parasitaemia on days 14, 21 or 28. The final classification of the recrudescence patients after adjustment by genotyping is shown in Table 4. The treatment failure rate at day 28 by intention-to-treat analysis was also estimated to 25% (95% CI: 8–50) and after adjustment by genotyping to 19% (95% CI: 5–43). Mean fever clearance time was calculated as 1.2 ± 0.7 days and, parasite clearance time was calculated as 1.3 ± 0.9 days.

pvdhfr/pvdhps genotypes and clinical response to SP

No significant differences were observed between recrudescence and non-recrudescence patients in terms of sex ratio, mean temperature at day 0, mean age, initial mean parasitaemia, haemoglobin concentration and mean number of mutations in *pvdhfr/pvdhps* genes (Table 5).

The *pvdhfr/pvdhps* genotype and therapeutic response of each isolate evaluated are listed in Table 6. Three of the four patients carrying the *pvdhfr/pvdhps* triple-mutant genotype (58R/117N, 383G) displayed ACPRs. The remaining patient was classified treatment failure at day 28. Considering the *pvdhfr* double mutant 58R/117N genotype, all 3 patients displaying treatment failure and 6 over the 11 displaying ACPRs carried it, providing an odd ratio for TF of 8.27 with a wide 95% CI of 0.35–197.6. The molecular/therapeutic outcome relationship can't be clearly depicted from these data.

Discussion

This study highlights the real burden of *P. vivax* infections by updating prevalence data in eight sites throughout Madagascar. Despite the likely underestimation of the prevalence of *P. vivax* due to the use of the RDT for malaria screening [2], this study confirms, however, that *P. vivax* is the second prevalent species in malaria infections after *P. falciparum*. The highest prevalence of *Plasmodium vivax* infections were found in the western side of Madagascar, certainly because of the predominance of ethnic groups of Indo-Asian and Middle Eastern origin, who carry the Duffy antigen [26].

SP resistance and related single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes were analysed in *P. vivax* samples from seven sites representative of the four major epidemiological strata for malaria. The two genes were screened by sequencing, to identify possible new mutations. The *P. vivax pvdhfr* gene is known to be

Table 4: Paired analysis of *pvmsp3*, *pvmmsp3* and microsatellite markers sequences used for differentiating recrudescences from reinfections for the four patients with a reoccurrence of parasitemia (Tsiroanomandidy, Madagascar, 2006).

Patient	Day	Allele sizes of microsatellites markers (bp)						Genotypes in		Final classification
		6.34	L34	2.21	8.332	14.185	L40	<i>pvmsp3</i> gene	<i>pvmmsp3</i> gene	
TDD062079	0	221/225	108	196	217	89/91	97	VK210	A	Recrudescence
	1	221/225	108	196	217	91	97	VK210	A	
TDD06viv12	14	225	108	196	217	91	97	VK210	A	Recrudescence
	0	219	108/110	196	222	na	97	VK210	na	
TDD06viv15	1	219	108/110	196	222	na	97	VK210	na	Reinfection or Relapse
	28	219	110	196	222	na	97	VK210	na	
TDD06viv20	0	225	110	196	na	98	97	VK210	na	Recrudescence
	1	230	104	205	na	93	97	VK210	na	
TDD06viv20	21	225	108	196	na	91	97	VK210	na	Recrudescence
	0	230	108	198	na	91	97	VK210	A	
TDD06viv20	1	230	108	198	na	91	97	VK210	A	Recrudescence
	14	230	108	198	na	91	97	VK210	A	

na: not available

Two infections (TDD062079 and TDD06viv12) were polyclonal as indicated by microsatellite markers analysis.

pvmsp3 sequences were classified as VK210 or VK247 types as described [17]; after DNA sequences alignment, no SNP was observed between day 0, 1 and the day of reoccurrent parasitemia.

pvmmsp3 sequences were classified into types A (1900 bp), B (1300 bp) or C (1100 bp) as described [40]; after DNA sequences alignment, one SNP was observed between TDD062079 at day 0 and the sequences obtained from both days 1 and 14. No differences were observed between TDD06viv20 sequences.

Table 5: Demographic, clinical and parasitological characteristics of baseline isolates from recrudescing and non-recrudescing patients (Tsiroanomandidy, Madagascar, 2006).

	Patients						P
	Recrudescing			Non-Recrudescing			
	No	Value	CI95%	No	Value	CI95%	
Patient characteristics							
No of males/No of females	3	3/0	-	11	4/7	-	
Age (years), mean	3	5.3	0 – 15.6	11	14.7	5.3–24.0	NS
Temperature (°C), mean	3	38.8	35.8–41.9	11	38.0	37.6–38.4	NS
Hematology							
Hemoglobin concentration (g/dL), mean	3	6.8	5.5 – 8.1	11	7.5	5.1–9.9	NS
Isolates at the baseline							
Parasitemia (parasites/μL), geometric mean	3	3434	361 – 32627	11	3307	1603–6823	NS
Mean number of mutations in <i>dhfr/dhps</i> genes	3	2.3	1.6–3	11	1.4	0.6–2.2	NS

One patient presenting a *P. falciparum* infection and the one presenting a *P. vivax* reinfection (or relapse, as indicated by genotyping analysis) were excluded from the non-recrudescing patients group.

highly diverse, supporting the use of such an approach [27]. A very high proportion of mutant-type isolates (72.2%) and diverse alleles were identified in these isolates, with 15 different mutant-type alleles observed if both *pvdhfr* and *pvdhps* gene mutations were taken into account. This is the first time that mutations at positions implicated in SP resistance have been described in *P. vivax* isolates from Madagascar.

Only two substitutions were identified in *pvdhps*, whereas six non-synonymous mutations, including four that have already been described, were found in *pvdhfr*. Mutations in these two genes do not play identical roles in the emergence of SP-resistance. Similar observations have been

made for *P. falciparum* [28,29]. Mutations seem occurring first in *pfdhfr* gene, then after in *pfdhps* gene when most of the parasites in the population have double- or triple-mutant alleles of the *dhfr* gene [22].

Mutations in *pvdhfr*, including 58R and 117N, have been implicated in pyrimethamine resistance. The 58R allele was found in 58% of all *P. vivax* isolates, in combination with 117N, which was found alone or in combination with other mutations in 63.5% of all isolates. Studies *in vitro* have shown that the mutation of a single base, leading to the replacement of a serine by an asparagine residue at codon 117, increases the IC₅₀ value of pyrimethamine by more than 80 times. The combination of this mutation

Table 6: The *pvdhfr/pvdhps* genotypes and therapeutic responses of 15 patients from Tsiroanomandidy (Madagascar, 2006) treated with sulphadoxine-pyrimethamine for *P. vivax* infections

Patient	Age (Years)	Sequence polymorphism in				No. of mutations in the 2 genes	Therapeutic response ^b
		<i>pvdhfr</i>	<i>Pvdhps</i>				
Trial no.		33	58	117	383		
VIV7	2	P	S	S	A	0	ACPR
60446	2.5	P	S	S	A	0	ACPR
VIV14	7	L	S	S	A	1	ACPR
VIV18	13	P	S	S	A	0	ACPR
60756	42	P	S	S	A	0	ACPR
VIV3	12	P	R	N	G	3	ACPR
VIV8	34	P	S	N	A	1	ACPR
VIV20	9	P	R	N	A	2	TF
62298	5	P	R	N	A	2	ACPR
60250	6	P	R	N	A	2	ACPR
60149	8	P	R	N	G	3	ACPR
VIV4	30	P	R	N	G	3	ACPR
VIV12	6	P	R	N	G	3	TF
62079	0.8	P	R	N	A	2	TF
VIV15	2	P	R	N	A	2	Reinfection or relapse

with the replacement of a serine by an arginine residue at codon 58 generates an enzyme more than 400 times more resistant to pyrimethamine than the wild-type enzyme [30,31]. The 57L/58R/117N, triple mutant previously observed in Thailand [14] and associated with low levels of parasite clearance was not found. No parasites of the 57L/58R/61M/117I quadruple mutant type, associated with a high risk of SP treatment failure, were also not found.

Two new mutations were found at codons 21 and 130 in the *pvdhfr* gene. The mutation at codon 130 accounted for 31.4% of the isolates. This mutation, present mostly at Miandrivazo (67% of isolates), was strongly associated with the 58R/117N double mutant. The P33L substitution accounted for only 6% of the isolates. This mutation was previously found to be associated with isolates of Comorian or Malagasy origin [14,25]. One of the unique features of the *pvdhfr* gene of *P. vivax* is the presence of a tandem repeat between amino-acid residues 70 and 110. Size polymorphism has been reported in this region [22,32], but no variation was observed in this study.

It was impossible to assess the impact of the new N130K mutation based on clinical data, because only the 58R/117N double mutant was observed in isolates from the patients enrolled in the clinical trial of SP efficacy, including the isolate with the A383G mutation in *pvdhps*. The use of yeast constructs might facilitate interpretation of the role of this mutation in resistance [33].

Because of the absence of a genotyping consensus protocol for *P. vivax* to differentiate recrudescence from reinfection, the use of a combination of different genes such as *pvama1*, *pvmisp1*, *pvmisp3* or microsatellite markers in paired analysis seems to be the safest available method. In this study, *pvcsp* and *pvmisp3* genes sequencing and six different microsatellite markers were used on samples from day 0, day 1 and day of reoccurrence. The use of microsatellite markers seems to be useful as more polyclonal infections could be detected. Obviously, the main limitation of this protocol was the well-recognized impossibility to prove that a *P. vivax* reoccurrence was a recrudescence, a relapse or a reinfection.

No significant association between *pvdhfr/pvdhps* polymorphisms and SP-treatment outcome was found, but all recrudescence patients were *pvdhfr* double-mutant carrier. This result strongly suggests that infection due to the *pvdhfr* 58R/117N double mutant is necessary but not sufficient for SP treatment failure to occur. The treatment outcome is likely to be favourable if the parasite has a wild-type genotype, but in parasites with mutations, outcome depends on the alleles present at the *pvdhfr* and *pvdhps* loci and the individual response of the patient [12].

Currently, it is well known that beside parasite factors, host factors such as nutritional status, immune response and rates of drug metabolism are involved in determining treatment outcome.

Surprisingly, almost 72.3% of the tested *P. vivax* isolates had mutations in the *pvdhfr* and/or *pvdhps* genes, despite SP never having been recommended as a first-line treatment for malaria, but only as a second-line treatment from 1998 to 2005. ACT is now recommended for the treatment of uncomplicated malaria regardless of the causal *Plasmodium* species. Nevertheless, self-treatment remains frequent in Madagascar since unpublished study has shown that three quarters of all febrile patients attending government health facilities have already used chloroquine in 67.6% of cases, cotrimoxazole (sulphamethoxazol/trimethoprim) in 23.4% and SP in 9.4% of cases. Cotrimoxazole is the drug most widely used to treat diarrhoea as well as respiratory infections [34]. Asymptomatic *P. vivax* infections and treatment with trimethoprim are probably common, resulting in the exposure of parasites to this drug. Mutations in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes may reflect overall antifolate drug pressure in Madagascar.

Previous studies have shown that *dhfr* mutant *P. falciparum* isolates were extremely rare [35], with only one case of infection with the 108N mutant reported in the south of Madagascar. Based the observations for *P. vivax* isolates, data for *P. falciparum* genotypes should be updated.

Conclusion

SP has been recommended for intermittent preventive treatment during pregnancy since 2005 in Madagascar. The regional office of the WHO for Africa currently recommends IPTp with SP in countries with a parasitological failure rate of less than 50% [36]. With a frequency of TF estimated at 19% and a prevalence of up to 17.5% of all malaria cases, *P. vivax* infections remains a public health problem in Madagascar and there is no doubt that SP will not be completely effective in IPTp strategy [37,38]. The extensive use of SP will increase the drug selection pressure on the parasite and favour the spread of resistance. As a result, this study highlights (i) that genotyping in the *pvdhfr* gene remains a useful tool to monitor the emergence and the spread of *P. vivax* SP-resistant in order to improve the national antimalarial drug policy, (ii) the issue of using SP as a monotherapy for IPT of pregnant women or children.

Authors' contributions

CBa performed laboratory work and wrote the manuscript. MT and CBo carried out sequencing and gave constructive advice. AR, LR and RR performed the field work.

MJ performed laboratory work. SP helped with the writing of the manuscript and gave constructive advice. DM was involved in all stages of this study.

Acknowledgements

We thank the patients and healthcare workers involved in the national network for the surveillance of malaria resistance in Madagascar (Réseau d'Etude de la Résistance, RER) from which these samples were obtained, and the staff of the Ministry of Health of Madagascar for their collaboration. We thank Hanitra Ranaivosoa, Didier Ralaizandry, Daimondra Raveloariseheno and Vony Rabekotorina for helping with field work.

This work was supported by grant from the French Ministry of Foreign Affairs, FSP/RAI 2001-168 project. Sample collection was funded by the Global Fund project for Madagascar round 3 (Community Action to Roll Back Malaria, Grant number: MDG-304-G05-M).

CBa is a PhD student supported by the Fondation Jeunesse Internationale (Fondation de France), BioMérieux "Prix BioMérieux infectiologie 2006", Association des Internes et Anciens Internes en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon "Prix R. Rizard", and the Hospices Civils de Lyon.

References

- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R: **The neglected burden of Plasmodium vivax malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**(1-2 Suppl):97-106.
- Ratsimbao A, Randriamanantena A, Raheerinjafy R, Rasoarilalao N, Menard D: **Which malaria rapid test for Madagascar? Field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in Madagascar.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(3):481-485.
- Robert V, Le Goff G, Andrianaivolambo L, Randimby FM, Domarle O, Randrianarivojosia M, Raharimanga V, Ravelosoa A, Ravaonjanahary C, Arieu F: **Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar.** *Int J Parasitol* 2006, **36**(12):1273-1281.
- Enquête auprès des Ménages.** Institut National de la Statistique de Madagascar; 2002:71-83.
- Jeremiah M SA: **Mortalité des enfants de moins de 5 ans à Madagascar.** *Enquête Démographique et de la Santé III à Madagascar* 2004:191-201.
- UNICEF: **Multiple Indicator Cluster Survey (MICS).** 2000.
- Rabarijaona LP, RT Ranaivo LH, Raharimalala LA, Rakotomanana F, Rakotonirabe EM, Ramarosandratana B, Rakotonjanabelo LA, Tafangy PB: **Paludisme sur les hautes terres centrales de Madagascar: stratégies de lutte.** *Med Trop* 2006, **66**(5):504-512.
- Randrianasolo L, Randriamanantena A, Ranarivelo L, Ratsimbao A, Domarle O, Randrianarivojosia M: **Monitoring susceptibility to sulfadoxine-pyrimethamine among cases of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Saharevo, Madagascar.** *Ann Trop Med Parasitol* 2004, **98**(6):551-554.
- Randrianarivojosia M, Arieu F, Raharimalala LA, Parzy D, Rogier C, Jambou R: **Current absence of pyrimethamine resistance of Plasmodium falciparum in Madagascar.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**(5):557-559.
- Randrianarivojosia M, Harisoa JL, Rabarijaona LP, Raharimalala LA, Ranaivo L, Pietra V, Duchemin JB, Rakotomanana F, Robert V, Mauclore P, Arieu F: **In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum to amodiaquine compared with other major antimalarials in Madagascar.** *Parassitologia* 2002, **44**(3-4):141-147.
- Rason MA, Arieu F, Rafidimanantsoa L, Andrianantenaina BH, Sahondra Harisoa JL, Randrianarivojosia M: **Monitoring the drug-sensitivity of Plasmodium falciparum in coastal towns in Madagascar by use of in vitro chemosensitivity and mutation detection tests.** *Parasite* 2002, **9**(3):247-253.
- Hawkins VN, Joshi H, Rungsahirunrat K, Na-Bangchang K, Sibley CH: **Antifolates can have a role in the treatment of Plasmodium vivax.** *Trends Parasitol* 2007, **23**(5):213-222.
- de Pecoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco LK: **Sequence variations in the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **92**(2):265-273.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirmeiz J, White NJ, Snounou G: **Association of genetic mutations in Plasmodium vivax dhfr with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlates.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(11):3122-3127.
- Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J: **Cultivation of Plasmodium vivax.** *Trends Parasitol* 2008, **24**(2):85-88.
- WHO: **Monitoring antimalarial drug resistance, Report of a WHO consultation.** Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2002.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G: **Practical PCR genotyping protocols for Plasmodium vivax using Pvcs and Pvmsp1.** *Malar J* 2005, **4**(1):20.
- Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP: **Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of Plasmodium vivax: global and local diversity.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**(4):518-525.
- Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, Severini C, Ayala FJ, Renaud F: **Meager genetic variability of the human malaria agent Plasmodium vivax.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(40):14455-14460.
- Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NP, White NJ, Anderson TJ: **Microsatellite variation, repeat array length, and population history of Plasmodium vivax.** *Mol Biol Evol* 2006, **23**(5):1016-1018.
- de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S: **Simultaneous identification of the four human Plasmodium species and quantification of Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003, **97**(4):387-390.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Renia L, Letourneur F, Charlieu JP, Leartsakulpanich U, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G: **Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax: evidence for sequential selection by drug pressure.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(5):1514-1521.
- Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Rieckmann K, Cheng Q: **Sulfadoxine resistance in Plasmodium vivax is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(6):2214-2222.
- Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999:95-98.
- Eldin de Pecoulas P, Basco LK, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A: **Analysis of the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence.** *Gene* 1998, **211**(1):177-185.
- Hurles ME, Sykes BC, Jobling MA, Forster P: **The dual origin of the Malagasy in Island Southeast Asia and East Africa: evidence from maternal and paternal lineages.** *Am J Hum Genet* 2005, **76**(5):894-901.
- Hastings MD, Maguire JD, Bangs MJ, Zimmerman PA, Reeder JC, Baird JK, Sibley CH: **Novel Plasmodium vivax dhfr alleles from the Indonesian Archipelago and Papua New Guinea: association with pyrimethamine resistance determined by a Saccharomyces cerevisiae expression system.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(2):733-740.
- Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, Sibley CH, Watkins WM: **Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**(4):991-996.
- Nzila AM, Nduati E, Mberu EK, Hopkins Sibley C, Monks SA, Winstanley PA, Watkins WM: **Molecular evidence of greater selective pressure for drug resistance exerted by the long-acting antifolate Pyrimethamine/Sulfadoxine compared with the shorter-acting chlorproguanil/dapsone in Kenyan Plasmodium falciparum.** *J Infect Dis* 2000, **181**(6):2023-2028.
- Hastings MD, Porter KM, Maguire JD, Susanti I, Kania W, Bangs MJ, Sibley CH, Baird JK: **Dihydrofolate reductase mutations in Plasmodium vivax from Indonesia and therapeutic response to**

- sulfadoxine plus pyrimethamine. *J Infect Dis* 2004, **189**(4):744-750.
31. Hastings MD, Sibley CH: **Pyrimethamine and WR99210 exert opposing selection on dihydrofolate reductase from Plasmodium vivax.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(20):13137-13141.
 32. Kaur S, Prajapati SK, Kalyanaraman K, Mohammed A, Joshi H, Chauhan VS: **Plasmodium vivax dihydrofolate reductase point mutations from the Indian subcontinent.** *Acta Trop* 2006, **97**(2):174-180.
 33. Djapa LY, Basco LK, Zelikson R, Rosowsky A, Djaman JA, Youkeu JN, Bolotin-Fukuhara M, Mazabraud A: **Antifolate screening using yeast expressing Plasmodium vivax dihydrofolate reductase and in vitro drug susceptibility assay for Plasmodium falciparum.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **156**(1):89-92.
 34. Randrianarivelojosia M, RL Randriamanantena A, Jambou R: **Chimiorésistance de Plasmodium falciparum sur les régions cotières malgaches.** *Méd Trop* 2000, **60**:243-249.
 35. Randrianarivelojosia M, RL Parzi D, Roux JF, Jambou R: **DHFR and Plasmodium falciparum resistance to antifolates: search for other mutations in the Indian Ocean region.** *Bull Soc Path Exot* 1999, **92**:282.
 36. WHO: **WHO Expert Committee on Malaria.** Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2000.
 37. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, Hkijiroen L, Looareesuwan S, White NJ: **Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy.** *Lancet* 1999, **354**(9178):546-549.
 38. Singh N, Shulda MM, Sharma VP: **Epidemiology of malaria in pregnancy in central India.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**(7):567-572.
 39. Rozen S, Skaletsky H: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol* 2000, **132**:365-386.
 40. Rayner JC, Corredor V, Feldman D, Ingravallo P, Iderabdullah F, Galinski MR, Barnwell JW: **Extensive polymorphism in the Plasmodium vivax merozoite surface coat protein MSP-3alpha is limited to specific domains.** *Parasitology* 2002, **125**(Pt 5):393-405.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Partie 2 : Analyse des microsatellites entourant les gènes *dhfr* et *dhps* des isolats de *P. vivax*

Les mécanismes à l'origine de la résistance à la SP sont les mêmes chez *P. falciparum* et *P. vivax*, constitués de mutations sur le gène *dhfr*, et dans une moindre mesure sur le gène *dhps*. Alors que la SP n'a jamais été recommandée pour le traitement des cas de paludisme à *P. vivax*, les co-infections avec *P. falciparum* étant fréquentes dans les zones où ces deux espèces sont endémiques, ce médicament a exercé une pression de sélection sur les isolats de *P. vivax*.

Pour comprendre l'émergence et la diffusion des résistances aux antipaludiques, plusieurs équipes se sont intéressées aux séquences microsatellites situées dans les régions proches des gènes de résistance. Des travaux ont été menés sur la résistance à la chloroquine et à la SP de *P. falciparum*. Une origine commune des souches quadruples mutées sur le gène *dhfr* a notamment été identifiée. Les travaux concernant *P. vivax* sont plus rares, et récemment Hawkins et al, 2008 [189] ont avancé l'hypothèse d'une origine multiple des génotypes triples et quadruples mutés de *P. vivax*, après analyse des séquences en amont et en aval du gène (700 pb) et de séquences microsatellites sur des isolats provenant de Colombie, Inde, Indonésie, Papouasie Nouvelle Guinée, Sri Lanka, Thaïlande et Vanuatu.

La prévalence des mutations sur le gène *dhfr*, et dans une moindre mesure sur le gène *dhps*, est importante à Madagascar. Les objectifs de notre étude ont été de cibler des séquences microsatellites entourant ces gènes afin de tracer les souches mutantes sur les gènes impliqués dans la résistance à la SP et d'apporter des arguments quant à l'émergence de ces souches et à leur diffusion à l'échelle du pays.

Matériel et méthodes

Recueil des isolats

Les isolats ont été collectés sur 7 sites sentinelles de Madagascar impliqués dans la surveillance de la résistance aux antipaludiques en 2006 et 2007 : Maevatanana et Miandrivazo à l'ouest de Madagascar, Moramanga/Saharevo et Tsiroanomandidy sur les

Hauts Plateaux, Ihosy et Ejeda dans le sud et enfin, Farafangana à l'est. Pour tout patient se présentant au dispensaire avec de la fièvre ou ayant présenté de la fièvre dans les 48 heures précédentes, une recherche de paludisme a été faite ; les patients ont été screenés par un test rapide (Optimal IT) et une recherche de parasites ainsi que l'identification d'espèce a été faite par lecture d'un frottis mince et d'une goutte épaisse. Du sang a été recueilli sur papier buvard pour extraction d'ADN par Instagen matrix (Biorad) et analyse de biologie moléculaire. Le diagnostic d'espèce a été confirmé ultérieurement par PCR en temps réel. Nous avons également travaillé sur 96 isolats de *P. vivax* collectés en Guyane française par l'Institut Pasteur de Guyane.

Amplification et séquençages des gènes *pvdhfr* et *pvdhps*

L'amplification et le séquençage des gènes *pvdhfr* et *pvdhps* ont été réalisés comme décrit précédemment. Les mêmes protocoles ont été suivis pour les isolats provenant de Guyane française.

Sélection des séquences microsatellites

En utilisant le programme Blast disponible sur la banque de données PlasmoDB, nous avons sélectionné le contig comprenant le gène *pvdhfr* (ctg 6950). Nous avons scanné 10 kb en amont et en aval du gène afin de rechercher la présence de séquences microsatellites à l'aide du programme mreps 2.5 accessible en ligne (<http://www.loria.fr/mreps>). Nous avons utilisés des paramètres de recherche larges : taille du motif de la séquence comprise entre 1 à 50 pb, nombre de répétitions du motif supérieur à 2. La même démarche a été suivie pour le gène *pvdhps* (ctg 7202) (Tableau 1).

Au total, 56 séquences microsatellites ont été identifiées autour du gène *dhfr*, et 18 autour de *dhps*. Nous avons sélectionné 6 marqueurs pour notre analyse sur *dhfr* et 4 sur *dhps* sur un critère de taille du motif, et de nombre de répétitions observées dans la séquence publiée.

Tableau 1. Séquences microsatellites sélectionnées dans les régions bordant en 5' et 3' les gènes *pvdhfr* et *pvdhps*.

Microsatellite	Motif	Nombre de répétitions	Localisation <i>pvdhfr</i>
1	AAATC	7	- 2,6 kb
2	AAATT	8	- 2,6 kb
3	AAATG	4	- 2,6 kb
4	CATATATA	2	+ 6 kb
5	TA	8	+ 6 kb
6	GTAT	3	+ 6 kb

Microsatellite	Motif	Nombre de répétitions	Position par rapport à <i>pvdhps</i>
1	TA	5	- 1,9 kb
2	AT	5	- 1,7 kb
3	AC	5	- 1,7 kb
4	CAACGCCA	16	- 1,4 kb

Amplification et séquençage des séquences microsatellites

Les fragments d'ADN ont été amplifiés par PCR nichées en utilisant 6 couples d'amorces. Ces amorces ont été dessinées à l'aide du programme Primer 3 disponible en ligne (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Les séquences de ces amorces sont indiquées dans le tableau 2. La composition des mélanges réactionnels pour les 2 PCR ainsi que les programmes des thermocycleurs sont présentés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Tableau 2. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'ADN contenant les séquences microsatellites ciblées en 5' et 3' des gènes *pvdhfr* et *pvdhps*.

Amorce	Séquence (5'-3')	T _m (°C)	Taille du fragment amplifié (pb)
dhfr-PM1F	ATCTCCTTGGAGGCAAAACT	57.9	812
dhfr-PM1R	TGGTCAAACAGTAGCGAACA	57.9	
dhfr-NM1F	CTCTGATGGGGAGGCTTGTT	61.6	733
dhfr-NM1R	AGCGGCTACACAGTGGAAAA	60.8	
dhfr-PM2F	ATGGGTAGAAAGAGGGAACG	58.1	328
dhfr-PM2R	GAAATGGGCCAGAAGGAG	58.1	
dhfr-NM2F	CCACATGTTGCATAGCTGGA	60.7	261
dhfr-NM2R	TACCTTCGGCCATCTCACTG	61.2	
dhps-PM1F	CTGCGTATCTCCATGTATGTG	56.7	985
dhps-PM1R	AGGGGAAAAAGGAAAAGAAA	57.0	
dhps-NM1F	TTCAACACATGCATTTATAACTTACG	59.5	727
dhps-NM1R	TTGGTGCGAATTATCTTGCTC	60.2	

Tableau 3. Compositions des mélanges réactionnels de PCR pour amplifier les séquences microsatellites entourant les gènes *pvdhfr* et *pvdhps*.

Réactif	1 ^{ère} PCR	PCR nichée
Buffer 10X (25mM MgCl ₂) eau	1 X	1 X
dNTP (20mM)	200 µM	320 µM
Amorce sens (10µM)	0,15 µM	0,20 µM
Amorce antisens (10µM)	0,15 µM	0,20 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1^{ère} PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Tableau 4. Programmes de PCR pour l'amplification des séquences microsatellites entourant le gène *pvdhfr*.

Programme PCR	1 ^{ère} PCR		PCR nichée	
	Microsat 1, 2, 3	Microsat 4, 5 et 6	Microsat 1, 2, 3	Microsat 4, 5 et 6
Dénaturation initiale	94°C, 4 min		94°C, 4 min	
Dénaturation	94°C, 20 s		94°C, 20 s	
x cycles	Hybridation	55°C, 20 s	57°C, 20 s	59.5°C, 20 s
	Elongation	72°C, 60 s	72°C, 30 s	72°C, 50 s
Elongation finale	72°C, 10 min		72°C, 10 min	

1^{ère} PCR, microsatellites 1, 2, 3 : 40 cycles

1^{ère} PCR, microsatellites 4, 5 et 6 : 30 cycles

2^{ème} PCR, 45 cycles

Tableau 5. Programmes de PCR pour l'amplification des séquences microsatellites entourant le gène *pvdhps*.

	1 ^{ère} PCR	PCR nichée
Dénaturation initiale	94°C, 4 min	
Dénaturation	94°C, 20 s	
Hybridation	55°C, 20 s	58°C, 20 s
Elongation	72°C, 70 s	72°C, 50 s
Nombre de cycles	40	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	

Les produits d'amplification ont été purifiés sur colonnes, utilisant un gel de polyacrylamide P-100 (Bio-Gel P-100, BioRad) à la Plate-forme Génomique 1, Institut Pasteur de Paris. Le séquençage a été effectué sur analyseur 3730 XL (Applied Biosystems). Les séquences ont finalement été assemblées à l'aide du logiciel Seqscape 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). L'alignement des séquences a été réalisé avec le programme BioEdit [201] et la recherche des motifs microsatellites présents avec le programme Fuzznuc disponible en ligne (<http://mobylye.pasteur.fr>). Nous avons utilisé en référence la séquence Salvador I (<http://www.plasmodb.org>).

Mesure de la diversité génétique

La diversité génétique a été mesurée par l'hétérozygotie (H_e) attendue de Nei à chaque locus. H_e a été calculée à l'aide du logiciel Genetix version 4.05 [202] et FSTAT version 2.9.4 [203]. Les différences des valeurs d'hétérozygotie observées ont été comparées par un test de Student, après vérification de l'hypothèse d'égalité des variances ou par un test de Mann-Whitney, avec le programme MedCalc version 9.1.0.1 (Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium).

Résultats préliminaires

Mutations sur les gènes *pvdhfr* et *pvdhps*

L'amplification et le séquençage ont permis d'obtenir des résultats interprétables sur 168 isolats pour le gène *dhfr* et 139 pour *dhps*. Des isolats provenant d'Antsiranana (Diego Suarez) ($n=2$), Fianarantsoa ($n=1$) ont été inclus. L'analyse a également été réalisée sur des échantillons provenant de Guyane française, fournis par l'Institut Pasteur de Guyane. Ces échantillons ont été collectés entre 2000 et 2005. Nous les avons amplifiés et séquencés sur les 2 gènes *dhfr* et *dhps* de façon à déterminer leurs profils sauvage ou muté. Tous les échantillons se sont avérés mutés sur *dhfr*, le génotype allant de simple muté en 117 à triple muté en 58, 117 et 173. Pour *dhps*, les échantillons étaient simple ou double mutés. Une mutation non décrite jusqu'alors a été identifiée au niveau du codon 116 de *pvdhfr*. Les génotypes observés sur le gène *dhfr* sont rappelés dans le tableau 6.

Tableau 6. Génotypes identifiés sur le gène *dhfr* des isolats de *P. vivax* collectés à Madagascar et en Guyane française

Génotype	Nombre d'isolats (Madagascar)	Nombre d'isolats (Guyane)
Sauvage :	51	-
Simple muté :		
21S	2	-
33L	10	-
117N	4	1
130K	1	-
Double muté :		
117N 130K	2	-
33L 130K	1	-
58R 117N	48	26
Triple muté :		
58R 117N 130K	43	-
58R 117N 129L	1	-
49R 58R 117N	5	-
58R 116G 117N	-	3
58R 117N 173L	-	51

La fréquence des allèles du gène *dhfr* identifiés sur les isolats de Guyane n'est pas significativement différente au cours du temps, entre 2000 et 2005 (Test de Fisher exact, $p=0,48$). Les effectifs disponibles en 2004 et 2005 sont trop faibles pour observer un changement, malgré une proportion de triples mutants 58R117N173L passant de 52,6% en 2000 à 74,1% en 2003 (Tableau 7).

Tableau 7. Distribution des allèles identifiés sur le gène *dhfr* des isolats de *P. vivax* collectés en Guyane française de 2000 à 2005.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
117N	0	1	0	0	0	0
58R117N	8	6	1	7	4	0
58R116G117N	1	2	0	0	0	0
58R117N173L	10	12	0	20	6	3

Outre les mutations non synonymes au niveau des codons 58, 116, 117 et 173, nous avons également identifié des mutations synonymes au niveau des codons 15 (gca : gcg) et 69 (tat : tac). La mutation 58R était codée par le codon aga (81% des isolats mutés), agg (18%) ou cgt (1%).

Analyse des isolats de Madagascar

Diversité sur les séquences microsatellites entourant le gène *pvdhfr*, lien avec les génotypes résistants

Nous avons identifié plusieurs allèles sur les microsatellites entourant le gène *dhfr*. Le nombre d'allèles, de répétitions du motif ainsi que l'hétérozygotie sont présentés pour chaque marqueur dans le tableau 8 pour les 168 isolats de Madagascar.

Tableau 8. Diversité observée sur les séquences microsatellites amplifiées des isolats de *P. vivax* de Madagascar.

	AAATC	AAATT	AAATG	CATATATA	TA	TGAT
Nombre d'allèles	6	6	4	2	5	1
Nombre de répétitions du motif	3 à 8	3 à 8	3 à 6	1 à 2	8 à 11	3
He	0,59	0,66	0,61	0,05	0,59	0

Sur ces 168 isolats, nous avons pu déterminer un haplotype sur 141 isolats. Un total de 39 haplotypes a été identifié, selon la taille de chaque microsatellite. Ces haplotypes ont été identifiés par numérotation selon la taille de chaque répétition des motifs AAATC, puis AAATT, puis AAATG, CATATATA, TA, TGAT. Chaque haplotype a été retrouvé chez 1 à 54 isolats. La figure 1 montre la distribution des haplotypes, avec 2 majoritaires (13 et 22). L'haplotype 13 était en fait constitué de combinaison suivantes : (AAATC)₄ (AAATT)₆

(AAATG)₃ (CATATATA)₁ (TA)₁₀ (TGAT)₃ et l'haplotype 22 : (AAATC)₅ (AAATT)₄ (AAATG)₄ (CATATATA)₁ (TA)₁₀ (TGAT)₃.

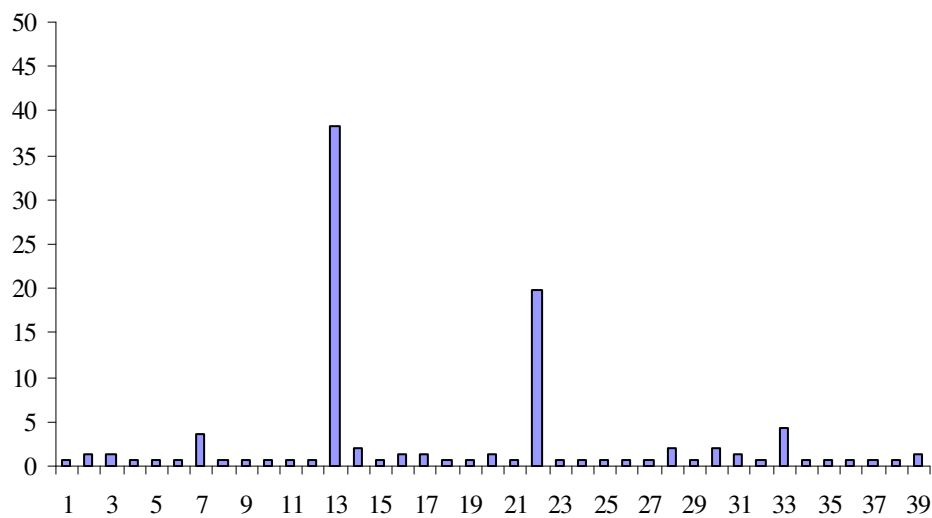


Figure 1. Distribution des haplotypes formés à partir des marqueurs microsatellites entourant le gène *pvdhfr*.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la diversité des haplotypes présents au sein des différentes populations parasitaires : sauvages, doubles mutées, triples mutées sur le gène *dhfr*. La présence de mutations synonymes sur le gène *dhfr* a été prise en considération. Ces mutations étaient présentes au niveau du codon 15 (gca : gcg).

Nous avons observé un rétrécissement de la diversité génétique des souches pour le génotype triple muté 58R 117N 130K. Nous avons en effet observé un total de 26 haplotypes définis par les marqueurs microsatellites chez les souches de type sauvage sur *pvdhfr* (n=44); les souches doubles mutées 58R 117N (n=39) étaient constituées par 19 haplotypes et les souches triple mutées (n=36) 58R 117N 130K par 7 haplotypes. Les valeurs d'hétérozygotie étaient de 0,40 pour les souches sauvages, 0,34 pour les doubles mutées et 0,14 pour les triples mutées. La différence était significative entre les populations sauvages ou doubles mutées et la population triple mutée (p<0,0001 et p=0,0005).

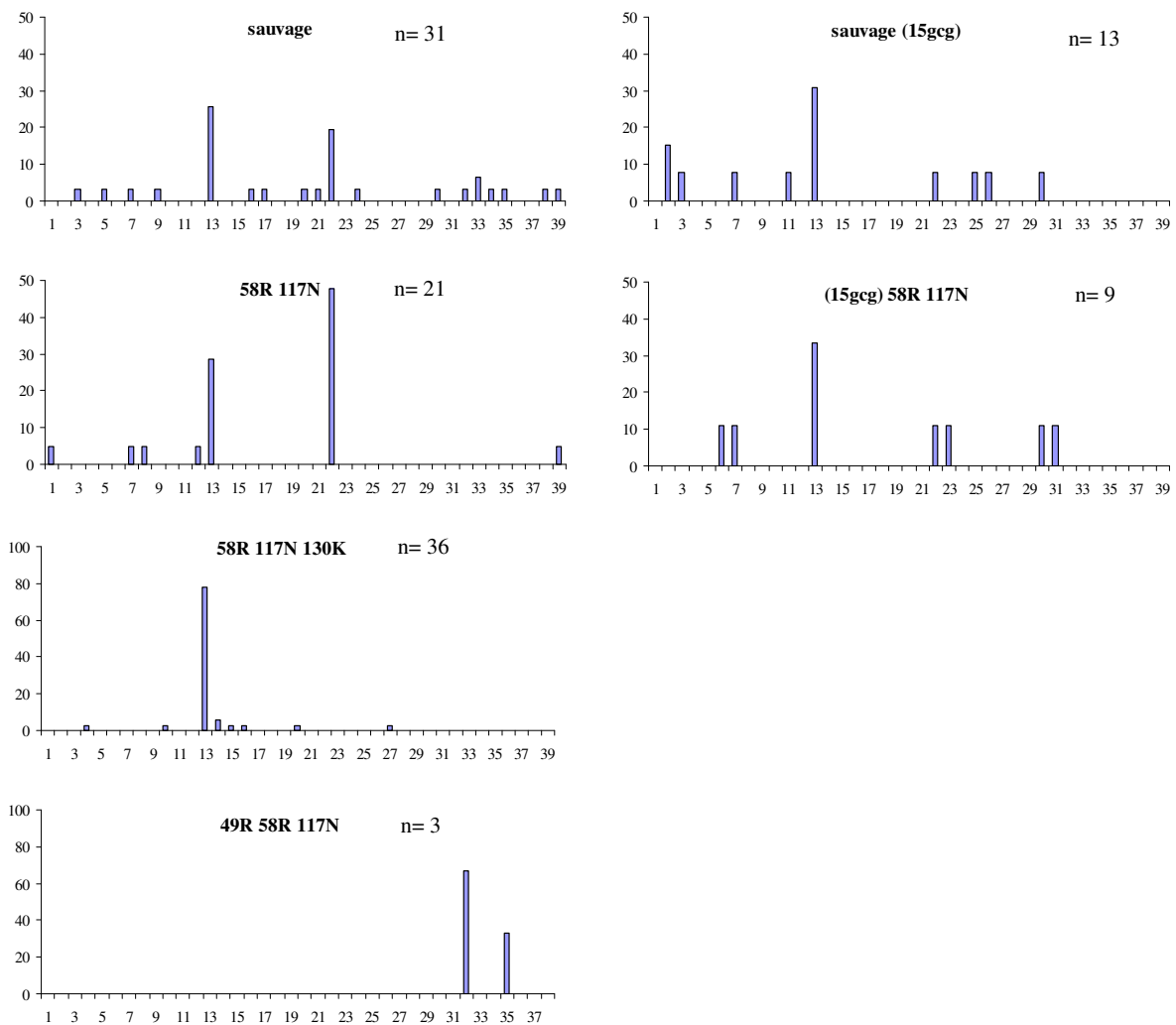


Figure 2. Distribution et fréquence des haplotypes observés selon le génotype *dhfr* des isolats de Madagascar.

Diversité sur les séquences microsatellites entourant le gène *pvdhps*, lien avec les génotypes résistants

Nous avons obtenus les profils des séquences microsatellites entourant le gène *pvdhps* sur 139 isolats. Cependant, les 3 séquences di-nucléotidiques amplifiées (TA à -1,9 kb, AT à -1,7 kb et AC à -1,7 kb) n'ont montré aucun polymorphisme. Tous les isolats sur lesquels ces séquences ont pu être obtenues (138/141) possédaient 5 répétitions de ces motifs.

Nous avons donc basé notre analyse sur le microsatellite polymorphe CAACGC/GCA et sur les allèles déterminés par une séquence répétée en tandem présente au sein du gène *pvdhps* (motif d'acides aminés GE(A/G)KLTN). 7 allèles ont été identifiés sur cette séquence et 10 sur la séquence microsatellite CAACGC/GCA. Cette séquence était en fait constituée d'un

enchaînement (CAACGCGA)₁ (CAACGCCA)_n (CAACGCGA)₁, le motif central étant répété sur nos isolats de 2 à 17 fois.

L'hétérozygotie chez les populations parasitaires sauvages était similaire sur les 2 loci et significativement plus importante que chez les souches mutées A383G ($p < 0,0001$) (Tableau 9).

Tableau 9. Diversité observée sur les séquences microsatellites entourant le gène *dhps* sur les isolats de *P. vivax* de Madagascar.

	Génotype <i>dhps</i>	
	sauvage	383G
Hétérozygotie		
- Séquence répétée en tandem	0,68 (n=108)	0,09 (n=22)
- CAACGC/GCA	0,61 (n=114)	0,09 (n=22)
Nombre moyen d'allèles par locus	8,5	2

En combinant les allèles observés sur les deux types de séquences, nous avons construit 22 haplotypes. On observe très clairement la réduction de la diversité des haplotypes chez les souches mutées ; un seul haplotype majoritaire est présent chez 19 souches (90% des souches) (Figure 3).

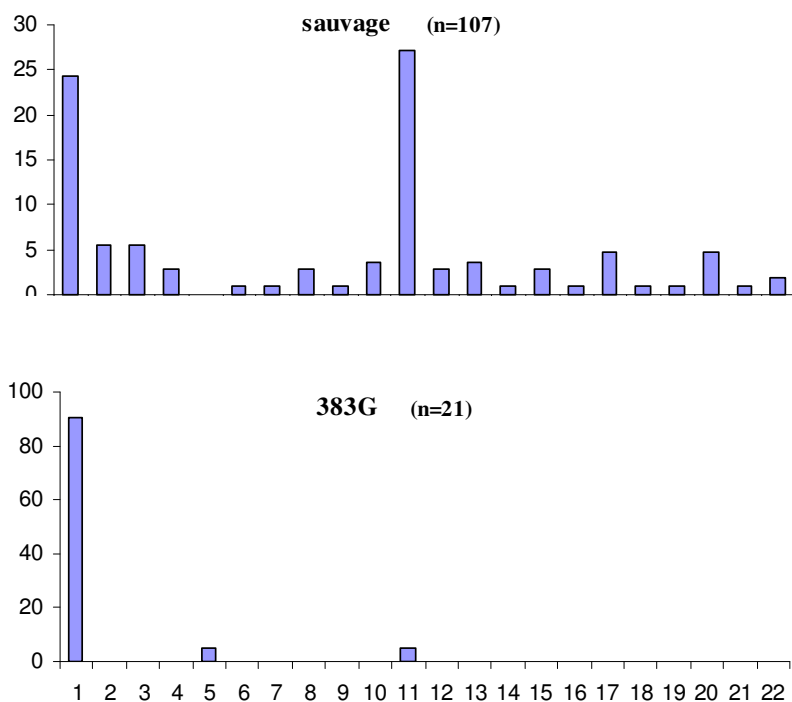


Figure 3. Distribution et fréquence des haplotypes observés selon le génotype *dhps* des isolats de Madagascar.

Analyse des isolats de Guyane

Diversité sur les séquences microsatellites entourant le gène *pvdhfr*, lien avec les génotypes résistants

Devant la faible diversité génétique observée sur 3 des séquences microsatellites, nous avons limité notre analyse aux 3 premiers marqueurs.

Tableau 10. Diversité observée sur les séquences microsatellites entourant le gène *dhfr* sur les isolats de *P. vivax* de Guyane française.

	AAATC	AAATT	AAATG
Nombre d'allèles	6	3	3
Nombre de répétitions du motif	3 à 9	4 à 7	3 à 5
He	0,64	0,52	0,44

Seuls 12 haplotypes ont été construits à partir de 79 isolats (97,5%) pour lesquels le séquençage sur les 3 marqueurs était interprétable. Deux haplotypes majoritaires regroupaient 75 % des isolats (Figure 4).

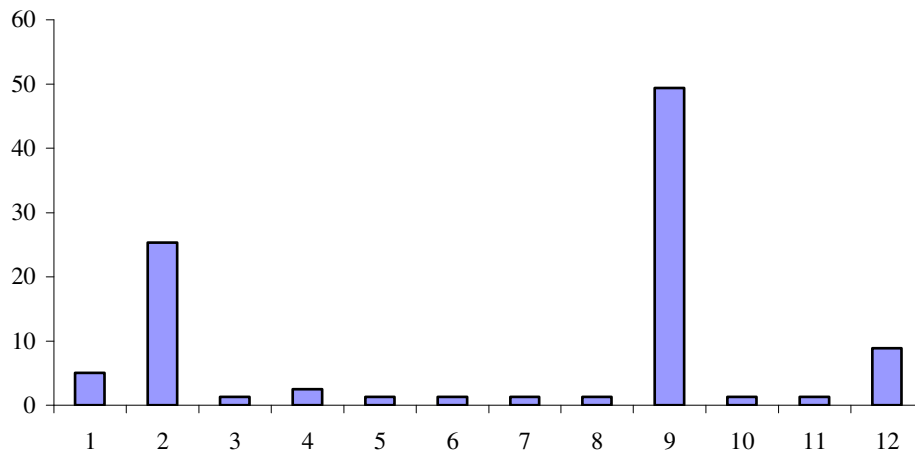


Figure 4. Distribution des haplotypes formés à partir des marqueurs microsatellites entourant le gène *pvdhfr* sur les isolats collectés en Guyane.

Ne disposant pas d'isolats sauvages sur le gène *dhfr*, nous avons comparé les souches doubles et triples mutées. Sur 49 isolats triples mutés pour lesquels un haplotype a pu être déterminé, 48 (98%) portaient une substitution synonyme sur le codon 69 (tat : tac). La mutation en 58 sur ces mêmes isolats était codée par le codon aga. Nous avons donc comparé à ces souches, les isolats doubles mutés 58R117N porteurs de la même substitution au niveau du codon 69 et du triplet aga au niveau du codon 58 (Figure 5). Il s'agissait du génotype majoritaire pour les souches doubles mutées (14 isolats, soit 58% des isolats pour lesquels nous avons pu déterminer un haplotype).

Les souches doubles mutées présentent 5 haplotypes différents sur les séquences microsatellites. En se limitant au génotype porteur de la substitution en 69, nous n'avons observé que 3 haplotypes (Figure 5). Un haplotype comprend plus de 60% des séquences triples mutées 58R117N173L, mais 7 autres haplotypes ont été identifiés dont 6 non retrouvés sur les souches doubles mutées.

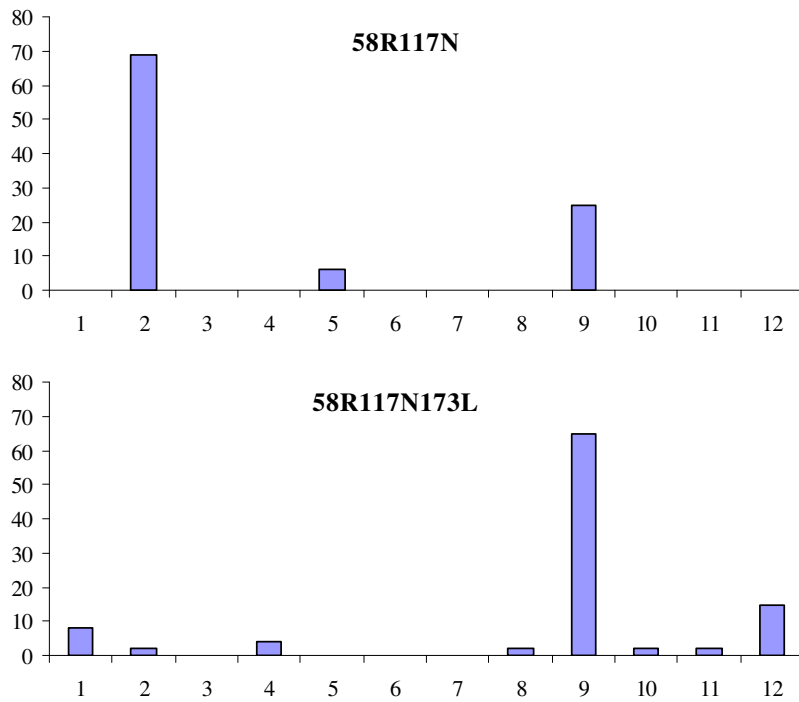


Figure 5. Distribution et fréquence des haplotypes observés selon le génotype *dhfr* double ou triple muté des isolats de Guyane.

Discussion

Ces résultats sont encore préliminaires et d'autres analyses vont être réalisées. Cependant, les études concernant les séquences microsatellites proches des gènes de résistance de *P. vivax* sont rares. Seules deux ont été publiées. Récemment, Hawkins et al. (2008) [189] ont avancé des arguments en faveur d'une origine multiple des souches résistantes de *P. vivax*. Cette observation a été portée après séquençage des fragments de 700 pb environ en amont et en aval du gène *pvdhfr*. La même hypothèse avait été émise par Alam et al, 2007 [188].

A Madagascar, 71% des isolats sont mutés sur le gène *pvdhfr* et 16% sur *dhps*. Les génotypes peuvent être simples à triples mutés sur *dhfr* et une seule mutation est retrouvée sur *dhps*. Nous avons mis en évidence une diversité importante des isolats sur 3 séquences de type microsatellites situées à 2,6 kb du gène *dhfr*. De la même façon, une séquence localisée à 1,4 kb du gène *dhps* a montré un polymorphisme important.

Sur nos isolats de Madagascar, nous avons pu mettre en évidence un rétrécissement de la diversité génétique des souches chez celles portant un génotype triple muté sur le gène *dhfr*. Néanmoins, il serait nécessaire de vérifier si cela n'est pas dû à un artefact de structuration des populations selon leur origine géographique. En effet, le génotype triple muté 58R117N130K a essentiellement été retrouvé sur le site de Miandrivazo, à l'ouest de Madagascar. Nous avons calculé la valeur de l'indice de fixation F_{st} entre les populations parasitaires de différents sites d'étude et retrouvé une valeur significative entre les populations de Maevatanana et Miandrivazo ainsi qu'entre celles de Miandrivazo et Tsiroanomandidy. Néanmoins, ces valeurs peuvent être le reflet de la sélection sur le site de Miandrivazo d'un génotype triple muté *dhfr*. Ne disposant que de 3 souches sauvages sur le gène *dhfr* sur ce site nous ne pouvons pas vérifier l'homogénéité de ces souches avec celle du reste de Madagascar. Concernant le gène *dhps*, 21 haplotypes différents ont été identifiés sur les isolats sauvages contre 3 sur les isolats portant la mutation 383G.

Sur les isolats provenant de Guyane française, 3 haplotypes ont été identifiés sur les souches doubles mutées 58R/117N portant une mutation synonyme sur le codon 69. Sur les souches triples mutées 58R/117N/173L, qui portent la même mutation sur le codon 69, 7 haplotypes différents ont été identifiés. Les données sur la prévalence des mutations en Guyane manquent bien que la prévalence de *P. vivax* dans cette région soit élevée. Cette étude sera poursuivie sur un plus grand nombre d'isolats.

Partie 3 : Sensibilité de *P. vivax* à la CQ et prévalence des mutations impliquées dans la résistance à cet antipaludique.

Alors que la résistance à la chloroquine est apparue rapidement chez *P. falciparum*, les premiers cas d'échecs thérapeutiques après traitement de cas de paludisme à *P. vivax* par la chloroquine n'ont été décrits qu'en 1989. Malgré l'utilisation de plus en plus répandue des ACT, la chloroquine reste un médicament peu cher et son utilisation est encore largement répandue. Devant les difficultés à maintenir *P. vivax* en culture en laboratoire et à réaliser des tests de chimiosensibilité *in vitro*, les marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques représentent le moyen le plus simple pour surveiller l'évolution et la propagation des isolats résistants. Cependant, peu d'études ont apporté à la fois des données moléculaires et cliniques et seule une association entre la mutation Y976F du gène *pvmdr1* et la résistance à la chloroquine (*in vitro*) a pu être démontrée récemment.

Alors que le taux d'échecs thérapeutiques observés à Madagascar après traitement des infections à *P. falciparum* est élevé [196], les données manquent concernant *P. vivax*. Le but de notre étude était de conduire un test d'efficacité thérapeutique *in vivo* et de rechercher les marqueurs moléculaires de résistance sur les gènes *pvmdr1* et *pvcr1-o* (exons 1 à 6) afin d'associer une valeur prédictive aux génotypes des souches.

Cette étude a été menée sur six sites sentinelles représentatifs de trois faciès de transmission du paludisme à Madagascar en 2006. Le test d'efficacité thérapeutique a été conduit selon les recommandations émises par l'OMS en 2001 pendant une durée de 28 jours.

En parallèle, un échantillon de sang a été recueilli sur papier buvard pour chaque patient inclus. Après extraction de l'ADN et vérification du diagnostic d'espèce par PCR en temps réel, les gènes *pvmdr1* et *pvcr1-o* ont été amplifiés et séquencés. Concernant le gène *pvcr1-o*, nous nous sommes limités aux 6 premiers exons, sur lesquels des mutations ont été décrites dans la littérature.

105 patients ont été inclus dans le test d'efficacité thérapeutique et ont reçu de la chloroquine. Après 28 jours de suivi, et un ajustement par PCR (génotypage des souches parasitaires réalisé par analyse des gènes *pvcsp*, *pvm3p3* et de 6 marqueurs microsatellites), le taux d'échecs thérapeutiques était de 5.1%. Sur les sites sentinelles des hautes terres centrales de Madagascar, ce taux atteignait les 14.8%. Aucune mutation non-synonyme n'a été

retrouvée sur le gène *pvcrt-o*. Nous avons identifié 10 mutations non-synonymes sur *pvmdr1* dont 5 nouvelles. Cinq mutations étaient particulièrement fréquentes car présentes chez 96.3% à 100% des isolats. Parmi ces mutations, nous avons identifié la mutation Y976F. 7 génotypes ont été identifiés, tous comportant de 4 à 7 mutations sur le gène *pvmdr1*. Les souches responsables d'échecs thérapeutiques appartenaient au génotype le plus fréquent, 513R/698S/908L/958M/976F/1076L. Nous n'avons ainsi pas mis en évidence d'association entre la présence de mutations sur le gène *pvmdr1* et le risque de subir un échec thérapeutique.

1 ***Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy**
2 **and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcr-t-o* genes**

3
4 Céline Barnadas^{1*}, Arsène Ratsimbaoa², Magali Tichit⁴, Christiane Bouchier⁴, Martial
5 Jahevitra³, Stéphane Picot¹, Didier Ménard³

6
7 ¹ EA4170, Parasitology and Tropical Medicine, Lyon 1 University, Lyon, France

8 ² Epidemiology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

9 ³ Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

10 ⁴ Plate-forme Génomique, Institut Pasteur de Paris, Paris, France.

11

12 * Corresponding author

13 Celine BARNADAS

14 EA4170, Parasitology and Tropical Medicine

15 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France

16 Phone: (00 33) 4 78 77 75 02

17 Fax: (00 33) 4 78 77 72 29

18 E-mail. cbarnadas@free.fr

19

20

21

22

23

24

1 **ABSTRACT**

2 No data was available concerning *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (CQ) in
3 Madagascar. We investigated the therapeutic efficacy of CQ in *P. vivax* malaria, the prevalence
4 of mutations in the *pvcr1-o* and *pvmdr1* genes before treatment and the association between
5 mutant parasites and the clinical response of the patients to CQ treatment. Clinical isolates were
6 collected at six sentinel sites from three epidemiological areas of malaria throughout Madagascar
7 in 2006. Patients were enrolled, treated and followed up according to the WHO 2001 guidelines
8 for *P. vivax* infections. Sequencing was used to analyse polymorphisms of the *pvcr1-o* (exons 1 to
9 6) and *pvmdr1* genes. The treatment failure rate, after adjustment for genotyping, was estimated
10 at 5.1% for the 105 patients included, ranging from 0% in the south to 14.8% in the foothills of
11 the Central Highlands. All samples were wild-type for *pvcr1-o* but mutant for the *pvmdr1* gene.
12 Ten non-synonymous mutations were found in the *pvmdr1* gene, including five new mutations,
13 four present at low frequency (1.3% to 7.5%) and the other, the S513R mutation, present at much
14 higher frequency (96.3%). The other five mutations, including Y976F had been described before
15 and had frequencies of 97.8% to 100%. Our findings suggest that chloroquine resistant *P. vivax*
16 isolates are present in Madagascar, particularly in the foothills of the Central Highlands. The
17 976Y *pvmdr1* mutation was not found to be useful for monitoring the CQ resistance. Further
18 efforts are required to develop suitable tools for monitoring drug resistance in *P. vivax* malaria.
19

INTRODUCTION

Plasmodium vivax remains the most geographically widespread human malaria parasite, affecting almost 40% of the population worldwide (14, 26). Its global burden is estimated at 132 to 391 million clinical malaria infections (17, 33). Most cases of *P. vivax* infection (80-90%) originate from South-east Asia, the Western Pacific and the Middle East, but a significant number of cases also occur in Central/South America and Africa (East and South Africa, including Madagascar). *P. vivax* malaria is generally considered benign and causes far fewer deaths than *Plasmodium falciparum*. However, morbidity rates are high, particularly in children and pregnant women (7), and the disease may have a large impact on socio-economic development (26, 33).

P. falciparum developed resistance to chloroquine (CQ) in various disease foci in the 1950s (47), but the first case of *P. vivax* resistance to CQ was not reported until 1989, in Papua New Guinea (37). Further sporadic cases were subsequently observed in the Western Pacific (Indonesia, Philippines) (1, 2, 12, 28, 35, 42, 44), South-east Asia (Myanmar, India, Vietnam) (11, 15, 22, 24, 29, 31, 40), South America (Colombia, Guyana) (32, 41) and the Middle East (Turkey) (21). Despite these reports, it remains difficult to estimate the worldwide prevalence of *P. vivax* resistance to CQ. Genotyping by using molecular markers are required for *in vivo* studies of the clinical efficacy of antimalarial drugs, so that the recurrence of parasitaemia due to reinfection can be distinguished from recrudescence. However, *P. vivax* genotyping in an antimalarial drug is confounded by the occurrence of relapses due to hypnozoite stages (which can be the same isolate at baseline or a different one) or recrudescence (8, 9, 19). *In vitro* assays, which should provide drug susceptibility data free from the effects of confounding factors, such as host immunity, are still difficult to conduct (45). The molecular mechanisms underlying CQ resistance in *P. vivax* malaria remain unclear and may involve multigenic loci, but two genes

1 orthologous to the *pfmdr1* and *pfprt* transporter-encoding genes (*pvmdr1* (5, 43) and *pvprt-o* (39))
2 have been identified as possible genetic markers of CQ resistance.

3 Malaria is endemic over three quarters of Madagascar, with almost one million clinical
4 cases reported per year, making this disease a major public health problem (20, 46). Four of the
5 five malaria parasites known to infect human beings are present. *Plasmodium vivax*, the second
6 most prevalent species after *P. falciparum* (6.3 % of all malaria cases) has a heterogeneous
7 geographical distribution, ranging from 0% in the east coast area to 17.5 % to the west of the
8 foothills of the Central Highlands (4). CQ therapeutic efficacy has been assessed in Madagascar
9 for *P. falciparum* (25) and *P. malariae* (3), but not for *P. vivax* malaria. CQ was replaced by
10 artemisinin-based combination therapy (AQ+AS, artesunate plus amodiaquine) as the
11 recommended first-line treatment for uncomplicated malaria in 2005, but CQ is nonetheless still
12 widely used. It is still recommended by the National Malaria Control Program (NMCP) for the
13 home management of presumed malaria in children (HMM) (36).

14 The aims of this study were (1) to assess the therapeutic efficacy of CQ in *P. vivax*
15 malaria, (2) to explore the prevalence of mutations in the *pvprt-o* and *pvmdr1* genes in samples
16 taken before treatment and the association between the presence of a mutant parasite and the
17 clinical response of the patient to CQ treatment.

18 MATERIALS AND METHODS

19 **Collection of *P. vivax* clinical isolates.** *P. vivax* clinical isolates were collected in 2006 from
20 individuals seeking malaria treatment at six sentinel sites located in the three epidemiological
21 strata for malaria throughout Madagascar: Ejeda and Ihosy in the South (epidemic-prone),
22 Tsiroanomandidy and Moramanga/Saharevo in the foothills of the Central Highlands (low-level
23 endemic area), and Maevatanana and Miandrivazo in the West (seasonal and endemic area).

24

1 All patients with fever or a history of fever in the 48 hours before their arrival at the health centre
2 were screened with a rapid diagnostic test (RDT), based on the detection of *Plasmodium*-specific
3 lactate dehydrogenase (pLDH) (OptiMAL-IT™, DiaMed AG®, Cressier sur Morat, Switzerland).
4 Giemsa-stained thin and thick blood films were prepared for each RDT-positive patient.
5 *Plasmodium* was identified to species level and parasite density was assessed by a skilled
6 microscopist. Blood from a finger prick was collected on filter paper once informed consent had
7 been obtained from each adult subject and from at least one of the parents of minors.

8 **Clinical efficacy of chloroquine in vivax malaria.**

9 ***Patient enrolment, treatment and follow-up procedures.*** The clinical trial was carried out in
10 2006, at previously identified sentinel sites for assessing the therapeutic efficacy of chloroquine
11 in *vivax* malaria. Patients with microscopically confirmed *P. vivax* infection were enrolled
12 according to the inclusion criteria of the 2001 WHO guidelines (48). All included patients were
13 weighed, and their medical histories (including previous antimalarial medication) recorded.
14 Clinical examination, including axillary temperature recording and Giemsa-staining of serial
15 thick and thin blood films, was carried out on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 and 28. Thick and thin
16 films were read by a skilled microscopist. Patients were treated with the standard CQ regimen (25
17 mg/kg per day for three days) and followed for 28 days. Patients were directly observed for 30
18 minutes after treatment, and the dose was readministered if vomiting occurred. Patients who
19 repeatedly vomited their first dose of study medication were excluded from the study. Blood was
20 blotted onto filter paper during follow-up and stored at 4°C for DNA analysis. Haemoglobin
21 concentration was determined on days 0 and 28 (HemoCue®, Anglholm, Sweden).

22 ***Outcome measures.*** Treatment outcomes were assessed according to WHO 2001 guidelines (48)
23 as "treatment failure" (TF; clinical deterioration due to *P. vivax* illness requiring hospitalisation,
24 with parasitaemia and axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ any time between days 3 and 28, or

1 parasitaemia on any day between days 7 and 28, regardless of clinical condition), or "adequate
2 clinical and parasitological response" (ACPR; absence of parasitaemia on day 28 without the
3 criteria for TF previously being met).

4 Patients with treatment failure were treated with artesunate (4 mg/kg on days 0, 1, and 2) plus
5 amodiaquine (10 mg/kg on days 0, 1, and 2), but their response to rescue therapy was not
6 assessed.

7 Patients were excluded after enrolment if any of the following occurred: (i) use of antimalarial
8 drugs outside of the study protocol; (ii) detection during follow-up of mixed malarial infections,
9 except at day 28; (iii) parasitaemia in the presence of a concomitant febrile illness potentially
10 interfering with the classification of treatment outcome; (iv) withdrawal of consent; (v) loss to
11 follow-up, (vi) protocol violation, or (vii) death due to a non-malaria illness.

12 **Laboratory procedures.** Blood smears were stained by incubation with 10 % Giemsa stain for 10
13 min. Asexual- and sexual-stage parasite counts were determined per 200 white blood cells.
14 Parasitaemia was calculated based on a white blood cell count of 8,000/ μ l. Thick-film
15 examinations were considered negative if no parasite was found in 100 high-power fields.

16 DNA was extracted from blood spots on filter paper with Instagene® Matrix resin (BioRad®,
17 Marnes la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. The identification of
18 the parasite species was confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR), using species-
19 specific primers, as described by de Monbrison (10), with a protocol adapted for the RotorGene®
20 3000 thermocycler (Corbett Life Science®, Sydney, Australia).

21 Molecular genotyping techniques were used to distinguish recrudescence from new infection or
22 relapse of liver stages, for all patients with treatment failure occurring after day 7. Briefly, blood
23 samples collected on the day of enrolment, on day 1 and on the day of treatment failure were
24 analysed for polymorphisms in the genes encoding circumsporozoite protein (*pvcsp*) (18) and

1 merozoite surface protein-3 (*pvmsp3*) (6) and in six different microsatellite markers, as
2 previously described (4). The PCR products of the genes encoding surface proteins were
3 sequenced, whereas microsatellite PCR products were genotyped on the basis of size, using a
4 standard-size Genescan 500 LIZ on an ABI Prism 3730XL. Genotype patterns on the day of
5 treatment failure were compared with those at treatment initiation and on day 1. An outcome was
6 defined as recrudescence if all alleles present at the time of failure were present at the time of
7 treatment initiation or on day 1, and defined as a reinfection or relapse otherwise.

8 **Sequencing of *pvcr-t-o* and *pvmdr1*.** The *pvcr-t-o* (exons 1 to 6) and *pvmdr1* genes were amplified
9 by nested PCR, using gene-specific primers (Table 1). For the outer *pvcr-t-o* PCR, amplification
10 took place in the following reaction mixture: 2 µl of 10 x buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each
11 dNTP, 0.25 µM of each primer, 1 U of FirePol *Taq* polymerase (Solis Biodyne) and 2 µl of
12 genomic DNA. PCR was performed under the following conditions: heating at 94°C for 5
13 minutes, followed by 40 cycles of heating at 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for
14 2 minutes, and a final extension period at 72°C for 10 minutes. For the inner *pvcr-t-o* PCR, the
15 following reaction mixture was used: 5.5 µl of 10 x buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each
16 dNTP, 0.27 µM of each primer and 2.5 U of FirePol *Taq* polymerase (Solis Biodyne) and 3 µl of
17 amplicon. PCR was performed under the following conditions: 94°C for 5 minutes, followed by
18 45 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes, and a final extension
19 period at 72°C for 10 minutes.

20 For the first and second rounds of PCR for *pvmdr1*, PCR conditions were similar to those for the
21 outer and the inner *pvcr-t-o* PCR, except that FirePol *Taq* polymerase (Solis Biodyne) was
22 replaced by TaKaRa LA *Taq* polymerase (TaKaRa Bio Inc) at the same concentration. The first
23 round of PCR was performed under the following conditions: 94°C for 5 minutes, followed by 30
24 cycles of 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 4.5 minutes, and a final extension

1 period at 72°C for 10 minutes. The conditions for the second round were as follows: 94°C for 5
2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds, 72°C for 4 minutes,
3 and a final extension period at 72°C for 10 minutes.

4 PCR products were purified by 96-well plate filtration (Millipore®, St. Quentin en Yvelines,
5 France), using polyacrylamide P-100 Gel (Bio-Gel P-100, BioRad®, Marnes-la-Coquette,
6 France). Sequencing reactions were carried out with the ABI PRISM BigDye Terminator cycle
7 sequencing ready reaction kit run on a 3730 xl Genetic Analyser (Applied Biosystems,
8 Courtaboeuf, France). Electrophoregrams were visualised and analysed with Seqscape v2.0
9 software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Amino-acid sequences were compared with
10 wild-type sequences (GenBank accession no. AF314649 for *pvcrt-o* and Genbank accession no.
11 AY571984.1 for *pvmdr1*), using BioEdit Sequence Alignment Editor software (16). Parasites
12 with mixed alleles (both wild-type and mutant alleles present) were considered mutant.

13 **Statistical analysis.** Data were entered and verified using EpiInfo 6.04© software (Centers for
14 Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States), and analysed with MedCalc©
15 software version 9.1.0.1 (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium). The
16 frequency of treatment failure at the sentinel sites was unknown. We therefore included all
17 patients with microscopically confirmed *vivax* malaria during the duration of the *in vivo* study,
18 between February and June 2006 (25). Efficacy data were assessed with a per-protocol analysis
19 including all patients who completed the study. An age-stratified analysis for patients '< 5 years',
20 '5 - 14 years' and '≥ 15 years' of age was planned. Categorical variables were compared using χ^2
21 or Fisher's exact tests, and continuous variables were compared using an independent samples *t*-
22 test or Mann-Whitney test.

23

1 The primary end point was the therapeutic response to CQ, based on parasitological and clinical
2 cure by day 28, and adjusted by genotyping. The secondary end points included fever clearance,
3 parasite clearance, change in haemoglobin levels between day 0 and the last day of follow-up.
4 Hypotheses were tested by determining the difference in risk, exact 95% confidence intervals and
5 *P* values. A *P* value (two-tailed) of less than 0.05 was considered statistically significant.

6 **Ethical approval.** The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of
7 the Ministry of Health of Madagascar (N°007/SANPF/2007). Informed written consent was
8 provided by all patients or their parents/guardians before inclusion in the study.

9 **Sequence deposition.** The exact sequence of each mutant allele has been submitted to GenBank
10 (accession numbers EU683813 to EU683819).

11 RESULTS

12 **Clinical and parasitological response to CQ.** Among the 5484 patients screened for malaria in
13 health facilities, 139 (2.5%) tested positive for *P. vivax*. In total, 105 (75.5%) of these patients
14 met all the inclusion criteria and were enrolled. The baseline characteristics of the included
15 patients are presented by site and by age group in Table 2. No significant differences were
16 observed between sites, except for the proportion of children under five years of age, which was
17 similar in the South (16.6%) and the West (18.6%), but higher in the Central Highlands (62.1%)
18 (*P* = 0.0006). Similarly, no significant differences were observed between age groups, except for
19 mean haemoglobin level at day 0, which was similar in the '5 - 14 years' and '> 15 years' age
20 groups (10.7 g/dl) but significantly lower in '< 5 years' age group (9.1 g/dl) (*P* = 0.03).

21 Clinical and parasitological monitoring was complete up to day 28 for 98 (93.3%) of the 105
22 enrolled patients. Five patients were lost to follow-up and two were excluded because of the
23 emergence of *P. falciparum* infection at day 21.

1 Results for treatment response to CQ are presented by age group and study site in Table 3.
2 Eighty-eight patients (89.8%) successfully cleared *P. vivax* parasitaemia after CQ treatment,
3 whereas 10 patients (10.2%, 95% CI: 5.0%-18.0%) experienced reoccurrence: 1 (10%) on day 7,
4 3 (30%) on day 21 (two with *P. falciparum* /*P. vivax* mixed infections) and 6 (60%) on day 28
5 (one with fever). After PCR correction, five cases of reoccurrence were confirmed as treatment
6 failure, giving a failure rate of 5.1% (95% CI: 1.7% - 11.5%). The frequency of treatment failure
7 was significantly higher in the Central Highlands (14.8%, 95% CI: 4.2% - 33.7%) than in the
8 South (0%, 95% CI: 0% - 45.9%) and West (1.5%, 95% CI: 0% - 8.3%) ($P = 0.02$), regardless of
9 the age group considered.

10 Figure 1 shows cumulative incidence of treatment failure over the 28-day follow-up period,
11 adjusted by genotyping.

12 For patients successfully treated, fever abated after 1.1 ± 0.5 days and parasite clearance took 2.1
13 ± 1.3 days. On day 28, haematological recovery was estimated by calculating the median of
14 individual increases in haemoglobin concentration, 1.6 g/dl (95% CI: 1.3 – 1.9). No severe
15 adverse effects attributable to the study medication were observed during the follow-up period.

16 **Analysis of the *pvcrt-o* gene.** The *pvcrt-o* gene was successfully sequenced in 95 of the 105 *P.*
17 *vivax* isolates collected (90.5%). All isolates were wild-type, including those from patients
18 displaying recrudescence. Only synonymous mutations or insertions (in introns) were found.

19 **Analysis of the *pvm-dr1* gene.** The *pvm-dr1* gene was successfully sequence in 80 of the 105
20 isolates collected (76.2%), at least four non-synonymous mutations being detected in each case.

21 Ten non-synonymous mutations were identified: five mutations described in previous studies
22 (G698S, M908L, T958M, Y976F and F1076L) and five new mutations (F194Y, S510T, S513R,
23 I636T and A829V) (Table 4). Six mutations were highly frequent and were found in almost all
24 isolates tested (from 96.3% to 100%): the five previously identified mutations and the S513R

1 mutation. The new mutations (other than S513R) were found only in isolates from the West and
2 had a low prevalence (from 1.3% to 7.5%). Seven different haplotypes were identified, with four
3 to seven amino-acid substitutions (Table 5). The most common haplotype was the
4 513R/698S/908L/958M/976F/1076L sextuple mutant-type (85.0%). This haplotype was the only
5 haplotype found at the South and Central Highlands sites. All seven haplotypes were found at
6 sites in western Madagascar.

7 **Characteristics of patients and parasites and clinical response to CQ.** No significant
8 differences were found between patients with and without recrudescence in terms of the
9 characteristics of the patients or of their isolates before treatment (Table 6). Isolates obtained
10 before treatment from patients who subsequently displayed recrudescence were wild type for the
11 *pvcr1-o* gene and carried the most common haplotype (513R, 698S, 908L, 958M, 976F, 1076L)
12 for the *pvmdr1* gene (Table 5).

13 DISCUSSION

14 CQ continues to be widely used in Madagascar, despite being officially replaced by ACT
15 in the first-line treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in 2005. CQ was recommended
16 for more than 50 years for both treatment and prophylaxis and has been used both in health
17 facilities and in the community. Pre-packaged CQ is still recommended by the Ministry of Health
18 and Family Planning for the home management of presumed malaria in children under the age of
19 five years. Recent studies have investigated the susceptibility of *P. falciparum* (25) and *P.*
20 *malariae* (3) to chloroquine in Madagascar. *P. malariae* remains sensitive to CQ, but high levels
21 of chloroquine resistance (from 19% to 64%) have been reported for *P. falciparum* isolates.

22 This study was the first to investigate the susceptibility of *P. vivax* to chloroquine in
23 Madagascar. We assessed the efficacy of CQ at national level, by carrying out our clinical trial at
24 six sentinel sites, selected as representative of the various epidemiological strata for malaria.

1 Treatment outcome was assessed after adjustment based on molecular genotyping techniques to
2 distinguish between recurrences of parasitaemia due to new infection and those due to
3 recrudescence or relapse. Since primaquine is not available in Madagascar, this drug was not used
4 to treat hypnozoite stages in this study. The occurrence of relapse can be due to the same isolate
5 as observed at baseline or a different one. It can lead to misclassification of the reoccurrent
6 parasiteamia, as recrudescence (falsely if antimalarial drug level is under minimum inhibitory
7 concentrations) in the first case or a new infection, in the second case. The interpretation of
8 genotyping in this context is uncertain and it is recommended to measure blood antimalarial drug
9 concentration (27). The absence of measurements of blood CQ concentration in patients
10 displaying recrudescence is the main limitation of this study. Overall, our data suggest that CQ
11 resistant *P. vivax* isolates are present in Madagascar, particularly in the foothills of the Central
12 Highlands. We have previously found a high frequency of sulfadoxine-pyrimethamine (SP)
13 treatment failure in patients with *vivax* malaria in the same area (4).

14 *In vivo* studies remain the gold standard method for assessing antimalarial drug efficacy.
15 However, due to the difficulties involved in determining treatment failure rates, particularly for *P.*
16 *vivax* malaria, molecular markers seem to be useful for monitoring the drug resistance of malaria
17 parasites. The K76T mutation in the *P. falciparum crt* gene is known to be involved in
18 chloroquine resistance, but very few data are available concerning the possible relationship
19 between the *P. vivax crt-o* and *mdr1* genes and CQ resistance. Only a few studies have been
20 carried out and associations between treatment failure and non-synonymous mutations in isolates
21 obtained before treatment are not yet clearly established (5, 30, 38). However, the Y976F
22 substitution in the *pvmdr1* gene is thought to be involved in chloroquine resistance in *P. vivax*
23 (23, 43). Suwanarusk *et al.* found that the geometric mean IC₅₀ of chloroquine was significantly
24 higher in *P. vivax* isolates carrying the Y976F mutation than in isolates with the wild-type allele.

1 We used a sequencing approach to screen for the presence of mutations in the target
2 genes, to confirm the involvement of these two genetic markers in CQ resistance in *P. vivax*. The
3 sequences analyses in the *pvcr1-o* were those of exons 1 to 6, in which mutations have already
4 been described (30). All the Malagasy *P. vivax* isolates sequenced were wild-type, with only
5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) or insertions in intron sequences (43). However, isolates
6 were more polymorphic for the *pvmdr1* gene, with eleven synonymous mutations and ten non-
7 synonymous mutations, five of had not previously been identified. Six of these mutations,
8 including Y976F, were highly frequent (from 96.3% to 100%). These findings may reflect the
9 CQ resistance situation in *P. falciparum*, in which the Y86F *pfmdr1* mutation is highly prevalent
10 even in the absence of the K76T *pfcr1* mutation (34). Comparison with the *SalI* reference strain
11 showed all samples to be of the mutant type, with haplotype patterns comprising between four
12 and seven mutations. We also found that the 510R and 513T amino-acid substitutions were
13 exclusive, suggesting that two different stepwise mutant selection processes had occurred. For the
14 510R amino-acid substitution, the 510T/908L/958M/1076L haplotype must have been selected
15 first and the 510T/698S/908L/958M/976F/1076L haplotype second, whereas for the 513T amino-
16 acid substitution, the 513R/908L/958M/976F/1076L haplotype must have been selected first,
17 followed by the 513R/698S/908L/958M/976F/1076L haplotype and, finally, the
18 513R/698S/829V/908L/958M/976F/1076L or 513R/636T/698S/908L/958M/976F/1076L
19 haplotype.

20 Unlike another recent study (43), we found no significant correlation between the *pvmdr1*
21 Y976F mutation and CQ treatment outcome, essentially because this mutation was already fixed
22 in the Malagasy *P. vivax* population. There are two possible reasons for this. Firstly, the Y976F
23 mutation may have been selected by CQ drug pressure over the last 50 years in Madagascar. This
24 possibility implies a role of this mutation in CQ resistance. Secondly, the Malagasy *P. vivax*

1 Randriamanantena, Hanitra Ranaivosoa, Didier Ralaizandry, Diamondra Raveloariseheno and
2 Vony Rabekotorina for helping with field work.

3 This study was supported by grants from Natixis/Impact Malaria through the *Observatoire de la*
4 *Résistance aux Antipaludiques* Project and the Genomics Platform, Pasteur Génopôle, Pasteur
5 Institute, France. Sample collection was funded by the Global Fund project for Madagascar round
6 3 (Community Action to Roll Back Malaria grant no. MDG-304-G05-M).

7 CBa is a PhD student supported by the *Fondation Jeunesse Internationale (Fondation de*
8 *France)*, BioMérieux “*Prix BioMérieux infectiologie 2006*”, *Association des Internes et Anciens*
9 *Internes en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon “Prix R. Rizard”* and *Hospices Civils de Lyon*.

10

11

12

1 **References**

- 2 **1. Baird, J. K., H. Basri, Purnomo, M. J. Bangs, B. Subianto, L. C. Patchen, and S. L.**
3 **Hoffman.** 1991. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia.
4 *Am J Trop Med Hyg* **44**:547-52.
- 5 **2. Baird, J. K., M. F. Sustriyu Nalim, H. Basri, S. Masbar, B. Leksana, E. Tjitra, R.**
6 **M. Dewi, M. Khairani, and F. S. Wignall.** 1996. Survey of resistance to chloroquine by
7 *Plasmodium vivax* in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**:409-11.
- 8 **3. Barnadas, C., A. Ratsimbaoa, H. Ranaivosoa, D. Ralaizandry, D. Raveloariseheno,**
9 **V. Rabekotonorina, S. Picot, and D. Menard.** 2007. Short report: prevalence and
10 chloroquine sensitivity of *Plasmodium malariae* in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*
11 **77**:1039-42.
- 12 **4. Barnadas, C., M. Tichit, C. Bouchier, A. Ratsimbaoa, L. Randrianasolo, R.**
13 **Raherinjafy, M. Jahevitra, S. Picot, and D. Menard.** 2008. *Plasmodium vivax dhfr* and
14 *dhps* mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-
15 pyrimethamine. *Malar J* **7**:35.
- 16 **5. Brega, S., B. Meslin, F. de Monbrison, C. Severini, L. Gradoni, R. Udomsangpetch,**
17 **I. Sutanto, F. Peyron, and S. Picot.** 2005. Identification of the *Plasmodium vivax mdr*-
18 like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from
19 different areas of endemicity. *J Infect Dis* **191**:272-7.
- 20 **6. Bruce, M. C., M. R. Galinski, J. W. Barnwell, G. Snounou, and K. P. Day.** 1999.
21 Polymorphism at the merozoite surface protein-3 α locus of *Plasmodium vivax*: global
22 and local diversity. *Am J Trop Med Hyg* **61**:518-25.

- 1 7. **Cattani, J. A., J. L. Tulloch, H. Vrbova, D. Jolley, F. D. Gibson, J. S. Moir, P. F.**
2 **Heywood, M. P. Alpers, A. Stevenson, and R. Clancy.** 1986. The epidemiology of
3 malaria in a population surrounding Madang, Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*
4 **35:3-15.**
- 5 8. **Chen, N., A. Auliff, K. Rieckmann, M. Gatton, and Q. Cheng.** 2007. Relapses of
6 *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined
7 intervals. *J Infect Dis* **195:934-41.**
- 8 9. **Cui, L., A. A. Escalante, M. Imwong, and G. Snounou.** 2003. The genetic diversity of
9 *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol* **19:220-6.**
- 10 10. **de Monbrison, F., C. Angei, A. Staal, K. Kaiser, and S. Picot.** 2003. Simultaneous
11 identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium*
12 DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop*
13 *Med Hyg* **97:387-90.**
- 14 11. **Dua, V. K., P. K. Kar, and V. P. Sharma.** 1996. Chloroquine resistant *Plasmodium*
15 *vivax* malaria in India. *Trop Med Int Health* **1:816-9.**
- 16 12. **Fryauff, D. J., S. Tuti, A. Mardi, S. Masbar, R. Patipelohi, B. Leksana, K. C. Kain,**
17 **M. J. Bangs, T. L. Richie, and J. K. Baird.** 1998. Chloroquine-resistant *Plasmodium*
18 *vivax* in transmigration settlements of West Kalimantan, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*
19 **59:513-8.**
- 20 13. **Goodman, S. M., and P. B. Benstead.** 2003. *The Natural History of Madagascar.* The
21 University of Chicago Press, Chicago and London.
- 22 14. **Guerra, C. A., R. W. Snow, and S. I. Hay.** 2006. Mapping the global extent of malaria
23 in 2005. *Trends Parasitol* **22:353-8.**

- 1 **15. Guthmann, J. P., A. Pittet, A. Lesage, M. Imwong, N. Lindegardh, M. Min Lwin, T.**
2 **Zaw, A. Annerberg, X. de Radigues, and F. Nosten.** 2008. *Plasmodium vivax* resistance
3 to chloroquine in Dawei, southern Myanmar. *Trop Med Int Health* **13**:91-8.
- 4 **16. Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
5 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- 6 **17. Hay, S. I., C. A. Guerra, A. J. Tatem, A. M. Noor, and R. W. Snow.** 2004. The global
7 distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*
8 **4**:327-36.
- 9 **18. Imwong, M., S. Pukrittayakamee, A. C. Gruner, L. Renia, F. Letourneur, S.**
10 **Looareesuwan, N. J. White, and G. Snounou.** 2005. Practical PCR genotyping
11 protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J* **4**:20.
- 12 **19. Imwong, M., G. Snounou, S. Pukrittayakamee, N. Tanomsing, J. R. Kim, A. Nandy,**
13 **J. P. Guthmann, F. Nosten, J. Carlton, S. Looareesuwan, S. Nair, D. Sudimack, N. P.**
14 **Day, T. J. Anderson, and N. J. White.** 2007. Relapses of *Plasmodium vivax* infection
15 usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis* **195**:927-33.
- 16 **20. Jeremiah, M., and A. Sulhuan.** 2004. Mortalité des enfants de moins de 5 ans à
17 Madagascar. *Enquête Démographique et de la Santé III à Madagascar*.191-201.
- 18 **21. Kurcer, M. A., Z. Simsek, and Z. Kurcer.** 2006. The decreasing efficacy of chloroquine
19 in the treatment of *Plasmodium vivax* malaria, in Sanliurfa, south-eastern Turkey. *Ann*
20 *Trop Med Parasitol* **100**:109-13.
- 21 **22. Luxemburger, C., M. van Vugt, S. Jonathan, R. McGready, S. Looareesuwan, N. J.**
22 **White, and F. Nosten.** 1999. Treatment of *vivax* malaria on the western border of
23 Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:433-8.

- 1 **23. Marfurt, J., I. Mueller, A. Sie, P. Maku, M. Goroti, J. C. Reeder, H. P. Beck, and B.**
2 **Genton.** 2007. Low Efficacy of Amodiaquine or Chloroquine Plus Sulfadoxine-
3 Pyrimethamine against *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Malaria in Papua New
4 Guinea. *Am J Trop Med Hyg* **77**:947-54.
- 5 **24. Marlar, T., K. Myat Phone, S. Aye Yu, G. Khaing Khaing, S. Ma, and O. Myint.**
6 1995. Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar. *Trans*
7 *R Soc Trop Med Hyg* **89**:307-8.
- 8 **25. Menard, D., A. Ratsimbaoa, M. Randrianarivejosia, L. Rabarijaona, L.**
9 **Raharimalala, O. Domarle, L. Randrianasolo, A. Randriamanantena, M. Jahevitra,**
10 **V. Andriantsoanirina, M. A. Rason, R. Raherinjafy, E. Rakotomalala, L. Tuseo, and**
11 **A. Raveloson.** 2008. Assessment of the efficacy of antimalarial drugs recommended by
12 the National Malaria Control Programme in Madagascar: Up-dated baseline data from
13 randomized and multi-site clinical trials. *Malar J* **7**:55
- 14 **26. Mendis, K., B. J. Sina, P. Marchesini, and R. Carter.** 2001. The neglected burden of
15 *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **64**:97-106.
- 16 **27. MMV.** 2007. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy:
17 genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the
18 Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization. 29–
19 31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands.
- 20 **28. Murphy, G. S., H. Basri, Purnomo, E. M. Andersen, M. J. Bangs, D. L. Mount, J.**
21 **Gorden, A. A. Lal, A. R. Purwokusumo, S. Harjosuwarno, and et al.** 1993. *Vivax*
22 malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet* **341**:96-100.

- 1 29. Myat Phone, K., O. Myint, L. Myint, Z. Thaw, A. Kyin Hla, and Y. Nwe Nwe. 1993.
2 Emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Myanmar (Burma). *Trans R Soc*
3 *Trop Med Hyg* **87**:687.
- 4 30. Nomura, T., J. M. Carlton, J. K. Baird, H. A. del Portillo, D. J. Fryauff, D. Rathore,
5 D. A. Fidock, X. Su, W. E. Collins, T. F. McCutchan, J. C. Wootton, and T. E.
6 Wellem. 2001. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2
7 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis* **183**:1653-61.
- 8 31. Phan, G. T., P. J. de Vries, B. Q. Tran, H. Q. Le, N. V. Nguyen, T. V. Nguyen, S. H.
9 Heisterkamp, and P. A. Kager. 2002. Artemisinin or chloroquine for blood stage
10 *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. *Trop Med Int Health* **7**:858-64.
- 11 32. Phillips, E. J., J. S. Keystone, and K. C. Kain. 1996. Failure of combined chloroquine
12 and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana,
13 South America. *Clin Infect Dis* **23**:1171-3.
- 14 33. Price, R. N., E. Tjitra, C. A. Guerra, S. Yeung, N. J. White, and N. M. Anstey. 2007.
15 *Vivax malaria*: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* **77**:79-87.
- 16 34. Rason, M. A., H. B. Andrianantenaina, F. Ariey, A. Raveloson, O. Domarle, and M.
17 Randrianarivelojosia. 2007. Prevalent *pfmdr1* n86y mutant *Plasmodium falciparum* in
18 Madagascar despite absence of *pfert* mutant strains. *Am J Trop Med Hyg* **76**:1079-83.
- 19 35. Ratcliff, A., H. Siswantoro, E. Kenangalem, M. Wuwung, A. Brockman, M. D.
20 Edstein, F. Laihad, E. P. Ebsworth, N. M. Anstey, E. Tjitra, and R. N. Price. 2007.
21 Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* to
22 chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia. *Trans R Soc*
23 *Trop Med Hyg* **101**:351-9.

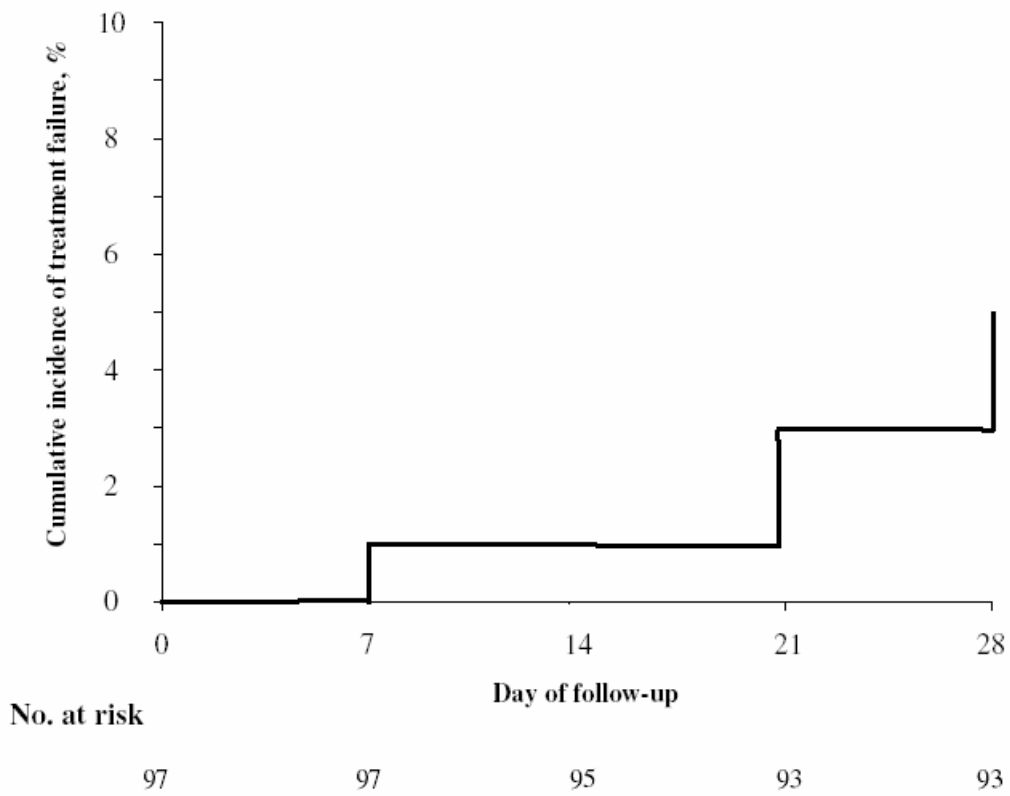
- 1 36. **Ratsimbaoa, A., M. Randrianariveojosia, P. Millet, J. L. Soares, L. Rabarijaona, B.**
2 **Rakotoson, D. Malvy, and D. Menard.** 2006. Use of pre-packaged chloroquine for the
3 home management of presumed malaria in Malagasy children. *Malar J* **5**:79.
- 4 37. **Rieckmann, K. H., D. R. Davis, and D. C. Hutton.** 1989. *Plasmodium vivax* resistance
5 to chloroquine? *Lancet* **2**:1183-4.
- 6 38. **Sa, J. M., T. Nomura, J. Neves, J. K. Baird, T. E. Wellems, and H. A. del Portillo.**
7 2005. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with
8 chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains.
9 *Exp Parasitol* **109**:256-9.
- 10 39. **Sa, J. M., M. M. Yamamoto, C. Fernandez-Becerra, M. F. de Azevedo, J.**
11 **Papakrivos, B. Naude, T. E. Wellems, and H. A. Del Portillo.** 2006. Expression and
12 function of *pvcrt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfprt*, in *Plasmodium falciparum* and
13 *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biochem Parasitol* **150**:219-28.
- 14 40. **Singh, N., S. S. Mishra, M. P. Singh, and V. P. Sharma.** 2000. Seasonality of
15 *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in tribal villages in central India (1987-1995). *Ann*
16 *Trop Med Parasitol* **94**:101-12.
- 17 41. **Soto, J., J. Toledo, P. Gutierrez, M. Luzz, N. Llinas, N. Cedeno, M. Dunne, and J.**
18 **Berman.** 2001. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J*
19 *Trop Med Hyg* **65**:90-3.
- 20 42. **Sumawinata, I. W., Bernadeta, B. Leksana, A. Sutamihardja, Purnomo, B. Subianto,**
21 **Sekartuti, D. J. Fryauff, and J. K. Baird.** 2003. Very high risk of therapeutic failure
22 with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in
23 Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg* **68**:416-20.

- 1 43. Suwanarusk, R., B. Russell, M. Chavchich, F. Chalfein, E. Kenangalem, V.
2 Kosaisavee, B. Prasetyorini, K. A. Plera, M. Barends, A. Brockman, U. Lek-Uthai,
3 N. M. Anstey, E. Tjitra, F. Nosten, Q. Cheng, and R. N. Price. 2007. Chloroquine
4 Resistant *Plasmodium vivax*: *In Vitro* Characterisation and Association with Molecular
5 Polymorphisms. PLoS ONE 2:e1089.
- 6 44. Tjitra, E., J. Baker, S. Suprianto, Q. Cheng, and N. M. Anstey. 2002. Therapeutic
7 efficacies of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine-sulfadoxine-
8 pyrimethamine in *vivax* malaria pilot studies: relationship to *Plasmodium vivax dhfr*
9 mutations. Antimicrob Agents Chemother 46:3947-53.
- 10 45. Udomsangpetch, R., S. Somsri, T. Panichakul, K. Chotivanich, J. Sirichaisinthop, Z.
11 Yang, L. Cui, and J. Sattabongkot. 2007. Short-term *in vitro* culture of field isolates of
12 *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. Parasitol Int 56:65-9.
- 13 46. UNICEF. 2000. Multiple Indicator Cluster Survey (MICS). Available at:
14 <http://www.childinfo.org/MICS2/newreports/madagascar/madagascar.pdf>.
- 15 47. Wellems, T. E., and C. V. Plowe. 2001. Chloroquine-resistant malaria. J Infect Dis
16 184:770-6.
- 17 48. WHO. 2001. Monitoring antimalarial drug resistance. Report of a WHO consultation,
18 Geneva, December 2001. Document WHO/CDS/RBM 2002.39.

19
20
21
22

1 **Figure 1: Cumulative incidence of treatment failure over the 28-day follow-up period,**
2 **Madagascar, 2006**

3
4



5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

1 **Table 1: Primers sequences used to amplify the *pvcrt-o* (exons 1 to 6) and *pvmdr1* genes**
 2

Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene
PVCG10 1-6 PF	5'- GCTACCCCTAACGCACAATG -3'	<i>pvcrt-o</i>
PVCG10 1-6 PR	5'- GATTTGGGAAAGCACAACGT -3'	
PVCG10 1-6 NF	5'- GATGAACGTTACCGGGAGTTGG -3'	
PVCG10 1-6 NR	5'- ATCGGAAGCATCAGGCAGGA -3'	
PVMDR1 PF	5'- ATGAAAAAGGATCAAAGGCAAC -3'	<i>pvmdr1</i>
PVMDR1 PR	5'- CTA CTTAGCCAGCTTGACGTAC -3'	
PVMDR1 NF	5'- TTGAACAAGAAGGGGACGTT -3'	
PVMDR1 NR	5'- CTTATATACGCCGTCCTGCAC -3'	

3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27

1 **Table 2: Baseline characteristics of the enrolled patients by site and age group, Madagascar, 2006**

2

Parameter	Total	Site			P-value*
		South	West	Central Highlands	
Total patients	105	6	70	29	-
No. of female patients (%)	53 (51.0)	3 (50.0)	33 (47.1)	17 (60.7)	0.39
Children < 5 years (%)	32 (31.0)	1 (16.6)	13 (18.6)	18 (62.1)	0.0006
Mean age (years) [range]	11.2 (0.8-54)	10.3 [3-19]	12.9 [0.8-54]	7.36 [1-47]	0.08
Median axillary temperature (°C) [range]	37.9 [36.2-41.1]	39.0 [37.5-40.0]	37.7 [36.2-41.1]	38.0 [37.5-40.1]	0.11
Geometric mean parasite density (/µl) [range]	3122 [200-52000]	3190 [750-52000]	3256 [200-33000]	2810 [250-37750]	0.87
Previous antimalarial treatment (%)	9 (8.9)	0	5 (7.1)	4 (13.8)	0.37
Mean haemoglobin (g/dl) [range]	10.2 [4.4-16.3]	11.8 [9.2-14.7]	10.6 [5.2-15.3]	9.0 [4.4-16.3]	0.01

3

Parameter	Age group			P-value*
	< 5 years	5 - 14 years	≥ 15 years	
Total patients	32	48	25	
No. of female patients (%)	17 (53.1)	23 (47.9)	13 (53.0)	0.85
Median axillary temperature (°C) [range]	38.0 [37.5-40.0]	37.7 [36.3-40.1]	38.0 [36.2-41.1]	0.37
Geometric mean parasite density (/µl) [range]	3821 [360-52000]	3205 [250-31000]	2294 [200-33000]	0.32
Previous antimalarial treatment (%)	2 (6.7)	4 (8.7)	3 (12.0)	0.78
Mean haemoglobin (g/dl) [range]	9.1 [4.4-16.3]	10.7 [5.2-15.3]	10.7 [5.5-16.0]	0.03

4

5 *South sites: Ejeda and Ihosy; West sites: Maevatanana and Miandrivazo; Central Highlands sites: Tsiroanomandidy and Moramanga/Saharevo*

6 * *P-value from Fisher's exact test*

7

8

9

1 **Table 3: Treatment response to chloroquine by site and age group, Madagascar, 2006**

2

Treatment response	Total		Site			P-value*			
	n	% (95% CI)	South	West	Central Highlands				
Day 28 Unadjusted by genotyping									
TF	10	10.2 (5.0 - 18.0)	0	0 (0 - 45.9)	4	6.2 (1.7 - 15.0)	6	22.2 (8.6 - 42.3)	0.04
ACPR	88	89.8 (82.0 - 95.0)	6	100	61	93.8 (85.0 - 98.3)	21	77.8 (57.7 - 91.4)	
Day 28 Adjusted by genotyping									
TF	5	5.1 (1.7 - 11.5)	0	0 (0 - 45.9)	1	1.5 (0 - 8.3)	4	14.8 (4.2 - 33.7)	0.02
ACPR	93	94.9 (88.5 - 98.3)	6	100	64	98.5 (91.7 - 100)	23	85.2 (66.3 - 95.8)	

3

Treatment response	Age groups						P-value*
	< 5 years		5 - 14 years		≥ 15 years		
	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	
Day 28 Unadjusted by genotyping							
TF	6	20.0 (7.7 - 38.6)	3	6.5 (1.4 - 17.9)	1	4.5 (0.1 - 22.8)	0.10
ACPR	24	80.0 (61.4 - 92.3)	43	93.5 (82.1 - 98.6)	21	95.5 (77.2 - 99.9)	
Day 28 Adjusted by genotyping							
TF	3	10.0 (2.1 - 26.5)	1	2.2 (0.1 - 11.5)	1	4.5 (0.1 - 22.8)	0.31
ACPR	27	90.0 (73.5 - 97.9)	45	97.8 (88.5 - 99.9)	21	95.5 (77.2 - 99.9)	

4

5 *South sites: Ejeda and Ihosy; West sites: Maevatanana and Miandrivazo; Central Highlands sites: Tsiroanomandidy and Moramanga/Saharevo*

6 * *P-value from Fisher's exact test*

7 *TF: Treatment failure; ACPR: adequate clinical and parasitological response*

8

9 **Table 4: Frequency distribution of mutation in *pymdr1* gene by sampling site, Madagascar, 2006**

1

Mutation in <i>pvmdr1</i> gene	No (%) of mutant-type alleles by sampling site			Total No (%)
	South (n = 5)	West (n = 53)	Central Highlands (n = 22)	
<i>F194Y</i>	0 (0)	6 (11)	0 (0)	6 (7.5)
<i>S510T</i>	0 (0)	3 (6)	0 (0)	3 (3.8)
<i>S513R</i>	5 (100)	50 (94)	22 (100)	77 (96.3)
<i>I636T</i>	0 (0)	1 (2)	0 (0)	1 (1.3)
G698S	5 (100)	51 (96)	22 (100)	78 (97.8)
<i>A829V</i>	0 (0)	1 (2)	0 (0)	1 (1.3)
M908L	5 (100)	53 (100)	22 (100)	80 (100)
T958M	5 (100)	53 (100)	22 (100)	80 (100)
Y976F	5 (100)	52 (98)	22 (100)	79 (98.8)
F1076L	5 (100)	53 (100)	22 (100)	80 (100)

2

3

South sites: Ejeda and Ihosy; West sites: Maevatanana and Miandrivazo; Central Highlands sites: Tsiroanomandidy and Moramanga/Saharevo

4

Known mutations are shown in bold typeface, and new mutations, in italics.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

1 *Table 5: Frequency distribution of pvmdr1 haplotypes by sampling site and treatment outcome*

2

<i>pvmdr1</i> haplotype		No (%) by sampling site			No (%) by treatment outcome		
		South (n = 5)	West (n = 53)	Central Highlands (n = 22)	Total No (%)	ACPR (n = 80)	TF (n = 4)
<i>No mutation</i>	Wild-type	0	0	0	0	0	0
<i>Quadruple mutant</i>	510T, 908L, 958M, 1076L	0	1	0	1 (1.3)	1	0
<i>Quintuple mutant</i>	513R, 908L, 958M, 976F, 1076L	0	1	0	1 (1.3)	1	0
<i>Sextuple mutant</i>	513R, 698S, 908L, 958M, 976F, 1076L	5	41	22	68 (85.0)	64	4
	510T, 698S, 908L, 958M, 976F, 1076L	0	2	0	2 (2.5)	2	0
<i>Septuple mutant</i>	513R, 698S, 829V, 908L, 958M, 976F, 1076L	0	1	0	1 (1.3)	1	0
	513R, 636T, 698S, 908L, 958M, 976F, 1076L	0	1	0	1 (1.3)	1	0
	194Y, 513R, 698S, 908L, 958M, 976F, 1076L	0	6	0	6 (7.5)	6	0

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

1 **Table 6: Demographic, clinical and parasitological characteristics of baseline isolates from Patients with and without recrudescence**

	With recrudescence (n = 5)	Without recrudescence (n = 98)	P-value
Patient characteristics			
Female (%) [95% CI]	60.0 [14.7 - 94.7]	48.4 [37.9 - 59.0]	0.86 *
Mean age (years) [range]	8.4 [1.3 - 27.0]	10.7 [0.8 - 54.0]	0.33 §
Mean temperature (°C) [range]	37.9 [37.5 - 38.4]	38.1 [36.2 - 41.1]	0.68 §
Previous fever (%) [95% CI]	100.0	92.4 [84.9 - 96.9]	0.73 *
Previous malaria treatment (%) [95% CI]	20.0	7.8 [3.2 - 15.4]	0.36 *
Mean haemoglobin concentration (g/dl) [range]	10.8 [5.5-16.3]	10.3 (4.4-16.0)	0.84 §
Baseline isolates			
Parasite density, geometric mean (/µl) [range]	4285 [2000 - 8000]	3098 [200 - 52000]	0.55 §
Mutant allele 194Y in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	0 [0 - 60.2]	7.0 [2.3 - 15.7]	0.75 ¥
Mutant allele 510T in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	0 [0 - 60.2]	4.2 [0.9 - 11.9]	0.84 ¥
Mutant allele 513R in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	95.8 [88.1 - 99.1]	0.84 ¥
Mutant allele 636T in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	0 [0 - 60.2]	1.4 [0 - 7.6]	0.94 ¥
Mutant allele 698S in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	97.2 [90.2 - 99.7]	0.89 ¥
Mutant allele 908L in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	100.0	1 ¥
Mutant allele 958M in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	100.0	1 ¥
Mutant allele 976F in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	98.6 [92.4 - 100.0]	0.94 ¥
Mutant allele 1076L in <i>pvmdr1</i> gene (%) [95% CI]	100.0	100.0	1 ¥

2 * P-value from χ^2 test; § P-value from Mann-Whitney test; ¥ P-value from Fisher's exact test

3

Partie 4 : Diversité génétique et structure des populations parasites de *P. vivax* à Madagascar.

Comprendre la structure génétique des populations parasites de *Plasmodium* est un paramètre important pour adapter au mieux les stratégies de lutte. *P. vivax* diffère de *P. falciparum* par au moins deux points importants : la formation des hypnozoïtes responsables d'accès de reviviscence et une capacité de transmission supérieure dans des conditions climatiques moins favorables. Ainsi ce parasite peut rester latent chez un patient infecté pendant plusieurs mois voire années et son cycle peut se produire à des températures plus basses. Ces deux facteurs peuvent favoriser un brassage des populations parasites et des échanges génétiques entre elles.

Les gènes codant pour des protéines de surface apportent peu d'information quant à la structure des populations parasites car ils sont soumis à une forte pression de sélection. Les marqueurs de choix pour de telles approches semblent être les séquences microsatellites. Le génome de *P. vivax* est moins riche en AT que celui de *P. falciparum* (60% contre 80% environ) et présente donc moins de répétitions di-nucléotidiques de type (AT) et (CA). Cependant, différentes études se sont intéressées à ces marqueurs chez *P. vivax* révélant peu ou beaucoup de polymorphismes selon notamment la nature des séquences choisies et surtout leur longueur [179, 181]. Les séquences répétées de façon importante constituent la plus grande source de polymorphisme.

Dans le cadre de notre étude sur la sensibilité de *P. vivax* aux antipaludiques à Madagascar, nous avons collecté des isolats sur 7 sites de ce pays. Nous avons observé que la prévalence de cette espèce parasite était hétérogène avec une prédominance sur les hautes terres centrales et à l'ouest de Madagascar. Nous avons séquencé le gène *dhfr* de ces isolats et trouvé une spécificité géographique des génotypes triples mutés 49R58R117N et 58R117N130K (identifiés respectivement à Maevatanana et à Miandrivazo, à l'ouest de Madagascar). D'autre part, dans un pays et des zones géographiques où l'endémicité du paludisme est modérée, nous avons été surpris de retrouver 70% des isolats mutés sur le gène *dhfr* malgré une utilisation de la SP limitée en traitement de 2^{ème} intention des cas de paludisme simple à Madagascar de 1998 à 2005.

Les objectifs de cette étude étaient donc d'étudier à travers le polymorphisme de séquences microsatellites la diversité génétique des souches de *P. vivax*, d'estimer le nombre d'infections polyclonales à cette espèce dans un pays à transmission modérée voir à faible

niveau de transmission, et enfin, d'appréhender la structure des populations parasitaires à travers les sites les plus représentatifs du paludisme à *P. vivax* à Madagascar.

Matériel et méthodes

Recueil des isolats

Les isolats ont été collectés sur 7 sites sentinelles de Madagascar impliqués dans la surveillance de la résistance aux antipaludiques en 2006 et 2007 : Maevatanana et Miandrivazo à l'ouest de Madagascar, Moramanga/Saharevo et Tsiroanomandidy sur les Hauts Plateaux, Ihosy et Ejeda dans le sud et enfin, Farafangana à l'est. Nous avons également obtenu des isolats d'Antsiranana (Diego Suarez, n=2) et de Fianarantsoa (n=1). Pour tout patient se présentant au dispensaire avec de la fièvre ou ayant présenté de la fièvre dans les 48 heures précédentes, une recherche de paludisme a été faite ; les patients ont été screenés par un test rapide (Optimal IT) et une recherche de parasites ainsi que l'identification d'espèce a été faite par lecture d'un frottis mince et d'une goutte épaisse. Du sang a été recueilli sur papier buvard pour extraction d'ADN par Instagen matrix (Biorad) et analyse de biologie moléculaire. Le diagnostic d'espèce a été confirmé ultérieurement par PCR en temps réel.

Sélection des séquences microsatellites

8 séquences microsatellites ont été sélectionnées à partir des données de la littérature [179, 181]. 6 d'entre elles étaient localisées sur des chromosomes différents et pour 2 d'entre elles, nous n'avons pas pu déterminer leur localisation chromosomique à partir du génome de *P. vivax* disponible. Les 8 séquences étaient constituées de séquences répétées di-nucléotidiques.

Tableau 1. Séquences microsatellites sélectionnées.

Microsatellite	Motif	Nombre de répétitions	Localisation
2.21	AC	17	chromosome 2
8.332	AT	17	chromosome 8
6.34	AC	16	chromosome 6
10.29	AT	16	chromosome 10
3.35	AT	18	chromosome 3
14.185	AT	13	chromosome 14
L34	CA	7	?
L40	AC	6	?

Amplification et séquençage des séquences microsatellites

Les fragments d'ADN ont été amplifiés par PCR simples ou nichées en utilisant 14 couples d'amorces. Ces amorces ont été dessinées à l'aide du programme Primer 3 disponible en ligne (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Les séquences de ces amorces sont indiquées dans le tableau 2. La composition des mélanges réactionnels pour les 2 PCR est présentée dans les tableaux 3 et 4.

Les programmes de PCR ont consisté en une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C, puis en 30 cycles (1ère PCR) ou 45 cycles (PCR nichée) comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 20 secondes, une étape d'hybridation pendant 20 secondes, puis une étape d'élongation à 72°C de 30 secondes. Une élongation finale de 10 minutes à 72°C a été réalisée. Lors de la première PCR, la température d'hybridation des amorces étaient de 56°C pour l'amplification du microsatellite 8.332 et de 57°C pour les microsatellites 14.185, 6.34, L34, 10.29 et 3.35. Lors de la PCR nichée, les températures d'hybridation étaient de 60,5°C pour le microsatellite L40, 61°C pour la séquence 14.185, 62°C pour les séquences 2.21, L34, 3.35, 62,5°C pour les séquences 6.34 et 8.33 et 63°C pour la séquence 10.29.

Des fluorochromes (6FAM et HEX) ont été utilisés pour marquer les amorces sens de la dernière PCR. Les produits de PCR ont été multiplexés en puits selon les 2 groupes présentés dans le tableau 2. Le polymorphisme de longueur des fragments d'ADN amplifiés et marqués a été mesuré par migration capillaire sur séquenceur ABI Prism 3730XL (Applied Biosystem) en utilisant comme étalon interne le marqueur GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard.

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des 8 séquences microsatellites.

Multiplex. Microsat		Amorces	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Taille amplicon (pb)
1	2.21	Pv2.21-NF	6FAM-CCATCTGCTCAAATCCGAAG	60.7	207
		Pv2.21-NR	GGCTCCTCCCTGTCTCTGTAG	60.4	
	14.185	Pv14.185-PF	TGCAGATATGCTGTCTGAAT	55.2	186
		Pv14.185-PR	GGGAAAAACTTGGTCACAC	55.4	
		Pv14.185-NF	6FAM-GCAGTTGTTGCAGATTGAGC	59.6	93
		Pv14.185-NR	TAAGGCGTGCACGTTATCAT	59.2	
	8.332	Pv8.332-PF	TGAAGCAATATAGCGATGAC	54.0	296
		Pv8.332-PR	CGGTGTAGTGTGGTACAATG	54.8	
		Pv8.332-NF	HEX-CCTCGATGGTGATGTGATGA	60.5	225
		Pv8.332-NR	GTATAACATGGCACCCGACCT	61.0	
	L40	PvL40-NF	HEX-GTTTACCAGGCCCAATTCAC	59.3	101
		PvL40-NR	GTTACACACGGGCGTATACAT	58.4	
2	6.34	Pv6.34-PF	CCCAATTAAGTGCAAATCA	54.6	334
		Pv6.34-PR	CATGTAAAGAGGCACATGG	55.0	
		Pv6.34-NF	6FAM-TGAGCGCTTTAAGCTTCTGC	60.9	230
		Pv6.34-NR	CAAAAATGAATCGTGGCACA	60.5	
	L34	PvL34-PF	TACCCAGCCTTATCTCTC	54.3	200
		PvL34-PR	AAATGCACAGACACTACGC	54.7	
		PvL34-NF	6FAM TTTTCCCTTCGGAAAAACG	60.0	110
		PvL34-NR	ACGACCATCACCTGCCATAG	60.9	
	10.29	Pv10.29-PF	CTCTTACGTACACGCTCGTT	55.8	380
		Pv10.29-PR	TCCACAAAATTGCCACTAAT	55.7	
		Pv10.29-NF	HEX-ATGCGCACCCCTATGTTTC	60.9	255
		Pv10.29-NR	TACGGAAATTTTCGGCAGGT	61.7	
	3.35	Pv3.35-PF	GTTACACGAGGTTTCCCTTT	55.8	280
		Pv3.35-PR	ACCTCATCTTTGCTTCCTTT	55.6	
		Pv3.35-NF	HEX-CGCCAAGTAGAGAAAGGGAAA	60.7	136
		Pv3.35-NR	CGCCACAGGATGTACATAAGAA	60.0	

Tableau 3. Compositions des mélanges réactionnels de PCR pour amplifier les séquences microsatellites 6.34, L34, 3.335, 8.332, 10.29, 14.185.

Réactif	1 ^{ère} PCR	PCR nichée
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	200 µM	200 µM
Amorce sens (10µM)	0,10 µM	0.25 µM
Amorce antisens (10µM)	0,10 µM	0.25 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1^{ère} PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Tableau 4. Compositions des mélanges réactionnels de PCR pour amplifier les séquences microsatellites 2.21 et L40.

Réactif	1 ^{ère} PCR
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X
eau	
dNTP (20mM)	200 µM
Amorce sens (10µM)	0,20 µM
Amorce antisens (10µM)	0,20 µM
Taq * (5U/µL)	1 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne
 3µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel

Détection des infections polyclonales

Les échantillons collectés peuvent contenir un ou plusieurs isolats de *P. vivax*. Nous avons considéré que les infections étaient polyclonales si plus d'un allèle était identifié sur au moins un locus (la hauteur du pic d'un allèle secondaire sur un locus était supérieure à 30% de celle du pic majoritaire pour ce même locus). Dans le cas où plus d'un allèle était identifié sur plus d'un locus, il était impossible de reconstruire un haplotype, et ces échantillons ont été écartés de l'analyse. Dans le cas où un polymorphisme n'était observé que sur un locus (un seul allèle sur les autres loci du même échantillon), nous avons reconstitué les haplotypes correspondants.

Mesure de la diversité génétique

La diversité génétique a été mesurée par le nombre d'allèles présents par locus (A) et la mesure de l'hétérozygotie attendue de Nei à chaque locus. He a été calculée à l'aide du logiciel Genetix [202] et FSTAT version 2.9.4 [203].

Structure génétique des populations

Nous avons recherché une structuration génétique des populations en utilisant les variables statistiques de Wright. L'indice de fixation Fst permet de mesurer la différenciation génétique entre des populations parasitaires. Pour cela, nous avons utilisé le programme FSTAT version 2.9.4 [203].

Déséquilibre de liaison

Nous avons utilisé un indice d'association I_A^S afin de tester un déséquilibre de liaison entre les loci. Le principe de ce teste repose sur la comparaison de la variance V_D du nombre d'allèles partagés entre chaque paire de d'haplotypes d'une population D avec la variance attendue sous l'hypothèse d'une association aléatoire des allèles (V_E) : $I_A^S = (V_D / V_E - 1) / (r - 1)$, où r représente le nombre de loci analysés. V_E est déterminée par permutation aléatoire des jeux de données, 10000 fois. L'existence d'un déséquilibre de liaison significatif est reconnue si V_D est supérieure à 95% des valeurs de V_E déterminées selon les permutations des données. Cette analyse a été réalisée selon le programme LIAN 3.5 disponible en ligne (<http://guanine.evolbio.mpg.de/cgi-bin/lian/lian.cgi.pl>).

Nous avons également recherché un déséquilibre de liaison par paires de loci. Pour cela nous avons utilisé le logiciel FSTAT version 2.9.4. Les associations entre chaque paire de loci ont été mesurées par un coefficient de corrélation R^2 .

Résultats préliminaires

Diversité génétique des populations parasitaires

Les séquences microsatellites ont été amplifiées sur 179 isolats collectés à Madagascar. 2 marqueurs ont donné des profils non interprétables et ont été abandonnés (10.29 et 3.35). Un haplotype complet a été obtenu sur 101 séquences (56.4%). Sur chaque locus, 3 à 16 allèles ont été identifiés. Le tableau 5 présente la fréquence de chaque allèle dans chacune de nos populations ; nous avons laissé à titre indicatif l'ensemble des populations, seuls les sites d'Ejeda (n=12), Maevatanana (n=23), Miandrivazo (n=65) et Tsiroanomandidy (n=66) ont été conservé pour l'analyse ultérieure.

Tableau 5. Fréquence des allèles dans chaque population d'isolats de *P. vivax* à Madagascar. L'hétérozygotie de chaque locus est indiquée ainsi que le nombre moyen d'allèles présents par population parasitaire.

	ATS	EJE	FAR	FNR	IHO	MAE	MIA	MOR	SHV	TDD
6.34	n=2	n=13	n=1	n=1	n=1	n=25	n=86	n=2	n=9	n=81
210	0,08
211	0,05
213	0,02
215	1	0,08	0,11	0,02
219	0,24	0,05	0,1
221	...	0,23	0,08	0,02	1	...	0,04
223	0,01
225	1	0,61	...	1	...	0,12	0,65	...	0,89	0,46
226	0,01
228	0,4	0,1	0,1
230	0,1	0,15
234	...	0,08	1	...	0,03	0,05
236	...	0,08
238	0,01
240	0,01
A	1	4	1	1	1	6	8	1	2	11
He	0	0,58	0	0	0	0,76	0,55	0	0,21	0,75
L34	n=2	n=15	n=1	n=1	n=1	n=32	n=95	n=2	n=9	n=81
104	0,03
108	1	0,6	1	1	1	0,81	0,78	1	1	0,72
110	...	0,2	0,03	0,14	0,22
112	...	0,2	0,17	0,05	0,06
A	1	3	1	1	1	3	4	1	1	3
He	0	0,58	0	0	0	0,32	0,37	0	0	0,44
2.21	n=2	n=13	n=1	n=1	n=1	n=29	n=89	n=2	n=9	n=79
181	0,07	0,07	0,09
186	0,02	...	0,11	0,03
192	0,5	0,07	0,13	...	0,11	0,09
194	0,07	0,02	0,07
196	0,5	0,85	1	1	1	0,66	0,69	1	0,78	54
198	0,14	0,03	0,09
200	...	0,15	0,03	0,08
202	0,03
A	2	2	1	1	1	5	7	1	3	8
He	0,67	0,27	0	0	0	0,55	0,51	0	0,39	0,67

	ATS	EJE	FAR	FNR	IHO	MAE	MIA	MOR	SHV	TDD
8.332	n=1	n=6	n=0	n=0	n=1	n=24	n=72	n=2	n=5	n=66
207	...	0,17	0,4	0,05
209	...	0,17	0,04	0,01	0,06
211	0,08	0,06	0,02
213	0,08	0,08	0,5	...	0,11
215	...	0,17	0,17	0,1	0,5	...	0,09
217	0,08	0,13	0,27
219	0,04	...	0,4	0,02
221	0,08	0,04	0,09
222	1	0,5	0,13	0,06	0,12
224	1	0,17	0,18	...	0,2	0,03
227	0,01	0,02
229	0,15	0,03
231	0,14	0,08
233	0,03
234	0,08
237	0,08
A	1	4	1	10	12	2	3	14
He	0	0,73	0	0,90	0,89	0,67	0,71	0,87
14.185	n=2	n=15	n=1	n=1	n=1	n=32	n=86	n=2	n=7	n=75
77	0,01
87	0,01
89	...	0,33	0,28	0,26	0,2
91	1	0,13	1	0,53	0,52	0,5	0,71	0,65
93	...	0,33	...	1	1	0,03	0,17	0,5	...	0,03
96	...	0,07	0,03	0,01	...	0,14	0,03
98	...	0,07	0,03	0,02	...	0,14	0,05
100	...	0,07	0,03
102	0,06
104	0,03
A	1	6	1	1	1	7	6	2	3	7
He	0	0,77	0	0	0	0,64	0,63	0,67	0,48	0,53
L40	n=2	n=15	n=1	n=1	n=1	n=29	n=94	n=2	n=9	n=81
85	...	0,13	0,1	0,02
89	0,01
97	1	0,87	1	1	1	0,9	0,97	1	1	1
A	1	2	1	1	1	2	3	1	1	1
He	0	0,24	0	0	0	0,19	0,06	0	0	0
He moyenne	0,11	0,53	0	0	0	0,56	0,50	0,22	0,30	0,54

Sur les 4 sites de Madagascar, la valeur de l'hétérozygotie attendue était similaire (0,50 à 0,56). Le nombre d'allèles moyen identifiés dans les populations variait de 3,5 à Ejeda, 5 à Maevatanana, 6,7 à Miandrivazo et 7,3 à Tsiroanomandidy.

Infections polyclonales

La proportion d'isolats comprenant plusieurs allèles est indiquée dans le tableau 6. Les effectifs des sites d'Antsiranana, de Ihosy, de Farafangana, de Fianarantsoa, de Moramanga et de Saharevo ($1 \leq n \leq 5$) étant faibles, nous ne les avons pas indiqués.

Tableau 6. Proportion d'infections multiples de *P. vivax* dans les infections palustres sur 4 sites de Madagascar

Loci	Ejeda		Maevatanana		Miandrivazo		Tsiroanomandidy	
	n	% d'infections multiples	n	% d'infections multiples	n	% d'infections multiples	n	% d'infections multiples
6.34	11	9,1	17	0	57	10,5	64	6,3
L34	12	8,3	23	4,3	63	6,3	65	9,2
2.21	11	9,1	21	9,5	59	10,2	64	4,7
8.332	5	20	16	25	46	34,8	52	15,4
14.185	12	16,7	23	4,3	56	10,7	61	6,6
L40	12	8,3	21	14,3	62	1,6	65	0
Global	12	25	23	39	65	52	66	21

La proportion d'infections multiples entre les différents sites, estimée par la présence de plus d'un allèle sur au moins un locus, n'était pas significativement différente ($p=0.20$, test de Fisher exact).

Différentiation génétique entre les populations parasitaires

Le tableau 7 nous montre une comparaison des sites 2 à 2 selon l'indice de fixation F_{st} . Nous n'avons conservé pour cette analyse que les échantillons mono-infectés ou les haplotypes reconstruits.

Tableau 7. Fst par paire entre les différentes populations parasites de *P. vivax*

	Ejeda	Maevatanana	Miandrivazo	Tsiroanomandidy
Ejeda		0.1041	0.0361	0.0621
Maevatanana	0.1041		0.0442	0.0327
Miandrivazo	0.0361	0.0442		0.0083
Tsiroanomandidy	0.0621	0.0327	0.0083	

Ces valeurs de Fst sont faibles et ne sont pas statistiquement significatives.

Déséquilibre de liaison

Nous n'avons pas mis en évidence de déséquilibre de liaison entre les différents loci (Tableau 8).

Tableau 8. Déséquilibre de liaison mesuré entre les 6 loci de *P. vivax* étudiés sur 4 sites de Madagascar.

	n	I_A^S	p
Ejeda	5	0.0630	0.21
Maevatanana	11	0.0023	0.44
Miandrivazo	31	-0.0019	0.50
Tsiroanomandidy	41	0.0219	0.15
Population totale	88	0.0022	0.42

Discussion

Les marqueurs microsatellites permettent d'apprécier la diversité génétique des isolats. Nous avons mis en évidence une hétérogénéité importante entre les différents marqueurs ; la valeur de l'hétérozygotie variait de 0,07 à 0,91 avec 4 marqueurs sur les 6 obtenus ayant une valeur supérieure à 0,50. L'hétérozygotie moyenne est donc diminuée par le choix de certains marqueurs microsatellites.

Nous n'avons pas mis en évidence de structuration des populations parasites au niveau des différents sites inclus dans notre étude. Le niveau de polymorphisme modéré de certains marqueurs utilisés ici conduit probablement à une sous-estimation de la différenciation pouvant se produire entre les différents sites. Nous n'avons pas mis en évidence de déséquilibre de liaison entre les 6 loci génotypés.

Alors que l'endémicité du paludisme à Madagascar reste faible nous avons mis en évidence un taux important d'infections polyclonales (21 à 52%). Ce taux est équivalent à celui publié par ailleurs sur des isolats de Colombie, du Laos, d'Inde ou de Thaïlande [179, 181]. Néanmoins, selon la méthode utilisée pour comptabiliser la proportion des infections polyclonales, d'importantes variations peuvent exister [181].

Les échanges génétiques entre les populations parasites sont favorisés par la capacité de *P. vivax* à former des hypnozoïtes et à rester à l'état latent chez les patients infectés. Cette période de latence est liée aux conditions climatiques de l'environnement des souches parasites. Elle n'est pas connue à Madagascar. Le fort taux d'infections polyclonales observé laisse supposer des mélanges de populations parasites au niveau des anophèles pouvant conduire à des recombinaisons génétiques. Concernant la résistance à la SP, nous avons mis en évidence une hétérogénéité géographique des génotypes observés, avec une localisation à Maevatanana des isolats triples mutés 49R/58R/117N et à Miandrivazo pour les isolats porteurs des mutations 58R/117N/130K. Il semblerait au vu des résultats apportés par l'étude des séquences microsatellites entourant le gène *dhfr* que ces génotypes aient émergés d'un nombre limité de souches. En l'absence de structuration des populations mise en évidence par le polymorphisme des microsatellites neutres, ces génotypes pourraient être apparus récemment. Si la circulation des souches est effective à Madagascar, ils pourraient cependant se propager rapidement.

Discussion

Ce travail a permis d'actualiser nos connaissances concernant l'importance de *P. vivax* à Madagascar et d'apporter de premières données sur la chimiosensibilité de ce parasite dans ce pays. Les données récoltées ont concerné un grand nombre de sujets (plus de 1600 cas de paludisme) et sont représentatives des différents faciès de transmission du paludisme à Madagascar. Les 8 sites sentinelles de l'étude sont situés sur les faciès tropical, équatorial, des hauts plateaux et du sud de Madagascar. Il en est ressorti une prévalence de plus de 90% de *P. falciparum* parmi les infections palustres totales. *P. vivax* représente quant à lui 6,3% des cas et *P. malariae* 1,1% [198]. Ils se positionnent donc comme, respectivement, la deuxième et la troisième espèce de *Plasmodium* à Madagascar. Mais ces chiffres ne traduisent pas l'hétérogénéité géographique puisque sur le site de Tsiroanomandidy, *P. vivax* représente 17,5% des infections palustres. C'est bien à l'ouest de Madagascar et sur la marge des hautes terres centrales que les cas de paludisme à *P. vivax* sont les plus fréquents.

La chloroquine n'est plus préconisée pour le traitement du paludisme simple à Madagascar depuis 2005 mais ce médicament reste encore largement utilisé. Il sera difficile de le retirer tout en continuant à recommander la prise en charge des cas de paludisme suspectés chez l'enfant de moins de 5 ans par ce même antipaludique. Alors que le niveau de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine est encore modéré à l'échelle du pays, mais élevé dans le sud de Madagascar (64% d'échecs thérapeutiques sur le site d'Ejeda) [196], le niveau de résistance de *P. vivax* reste faible. La situation doit donc être surveillée régulièrement. Cependant, la réalisation de tests *in vivo* est difficile à effectuer. Les marqueurs moléculaires semblent constituer un bon outil pour permettre cette surveillance. Nous avons essayé de développer au cours de notre étude un test *in vitro* pour mesurer la chimiosensibilité des isolats de *P. vivax* collectés sur le terrain. Notre objectif était en effet de récolter les 3 types de données complémentaires concernant la résistance aux antipaludiques. Après la mise au point d'un protocole de culture pendant 36 à 48h en fonction des stades parasitaires présents et l'adaptation des conditions de culture à *P. vivax* (augmentation de la quantité d'albumax, utilisation d'un milieu RPMI/Waymouth...), nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés pratiques. La difficulté d'acheminement des prélèvements dans un délai court a constitué la principale entrave au déroulement de ces tests. La délocalisation d'un laboratoire sur un site sentinelle a été réalisée sur une courte période, mais là aussi nous nous sommes heurtés à des difficultés d'ordre pratique : délestages électriques... Les tests *in vitro* peuvent toutefois constituer une alternative intéressante [100]. Des efforts doivent être déployés afin de disposer d'autres outils que la microscopie pour détecter l'inhibition de la croissance

parasitaire sous l'effet des antipaludiques testés comme cela a été mis au point pour *P. falciparum* [149]. La difficulté est cependant accrue dans le cas de *P. vivax* dont la répllication *in vitro* est plus difficile à obtenir.

Alors que des marqueurs moléculaires liés à la chloroquino-résistance ont été clairement identifiés (gène *pfcr*, mutation K76T) pour *P. falciparum*, la situation pour *P. vivax* reste encore à préciser du fait d'un manque de données. Une implication de la mutation *pvmdr1* 976F a été proposée [92, 100] mais ces résultats n'ont pas été confirmés dans le cadre de notre étude. Il semblerait en revanche que cette mutation soit impliquée dans la résistance à une autre amino-4-quinoléine, l'amodiaquine [101]. La situation à Madagascar semble toutefois revêtir quelques particularités : la mutation K76T sur le gène *crt* de *P. falciparum* n'a été que rarement retrouvée malgré une résistance observée *in vivo* [196, 197]. En revanche, une prévalence importante de la mutation 86Y sur le gène *pfmdr1* a été publiée [197]. De même que chez *P. falciparum*, la valeur prédictive d'échec thérapeutique des marqueurs moléculaires restent à explorer chez *P. vivax*.

Le diagnostic d'espèce n'est que rarement réalisé à Madagascar dans le cadre du diagnostic de paludisme. La majorité des patients est traitée sur le simple argument de fièvre, le diagnostic microscopique étant souvent impossible à réaliser dans les dispensaires ou les centres de santé de base. Nous avons observé un fort taux de résistance à la SP (malgré un faible effectif de patients suivis) et en particulier une forte prévalence des marqueurs moléculaires associés à cette résistance, avec plus de 70% des isolats mutés sur le gène *dhfr*. La SP, recommandée dans le traitement de deuxième intention, a été plus faiblement utilisée que la chloroquine à Madagascar. Néanmoins, la pression médicamenteuse exercée contre *P. falciparum* a probablement sélectionné des isolats mutés de *P. vivax*.

Notre étude basée sur le séquençage de marqueurs microsatellites entourant le gène *dhfr* et le gène *dhps* a mis en évidence une origine plus réduite des souches porteuses de mutations par rapport aux souches sauvages, en particulier des génotypes triples mutés sur le gène *dhfr* (58R/117N/130K) et du génotype simple muté 383G sur *dhps*. En l'absence d'une structuration des populations parasitaires et au vu des caractéristiques biologiques de *P. vivax* qui peut rester latent au sein de son hôte, les souches semblent circuler. Si ces génotypes semblent être apparus récemment et sont localisés pour l'instant dans certaines zones géographiques, on peut craindre leur expansion prochaine. Il sera donc nécessaire de poursuivre la surveillance au sein des différents sites sentinelles. Le risque d'émergence et de diffusion des résistances est en outre augmenté par les recombinaisons pouvant se produire

chez le moustique. Cela est favorisé par un fort taux d'infections polyclonales chez les patients.

Par sa résistance à des températures extérieures moins clémentes que *P. falciparum*, *P. vivax* a des capacités d'adaptation plus fortes, optimisées par la durée de latence de l'infection au niveau hépatique. La majorité des pays en zone d'endémie et c'est le cas de Madagascar ont adopté un changement de leur politique nationale de traitement se tournant vers l'utilisation des ACT. L'efficacité de ces molécules dans le traitement du paludisme à *P. vivax* a été démontrée par quelques études [129, 137-140]. Cependant, la primaquine reste la seule molécule disponible capable à l'heure actuelle d'éliminer les formes hypnozoïtes. Des études ont montré que même en zone de faible endémicité, 20% des patients pouvaient avoir un accès de reviviscence symptomatique chaque année, cela entraînant une morbidité importante [8]. Les dérivés de l'artémisinine, par leur demi-vie courte, ont une efficacité rapide. Cependant, cette action rapide pourrait favoriser l'émergence de parasites sanguins à partir des formes hypnozoïtes de façon plus précoce [139, 140]. La combinaison avec une molécule de demi-vie longue peut permettre de retarder la réapparition d'une parasitémie à partir des hypnozoïtes et donc la formation d'une nouvelle génération de gamétocytes et la transmission du parasite.

De nombreux paramètres doivent être pris en compte dans les stratégies de lutte contre le paludisme causé par *P. vivax*. Afin d'adapter au mieux les stratégies d'intervention, il est nécessaire de mieux comprendre l'émergence et la propagation des résistances. L'acquisition de la résistance aux antipaludiques peut être un phénomène complexe, et la relation entre les outils disponibles pour la surveiller est souvent délicate. Les facteurs liés à l'hôte et à l'environnement sont à prendre en considération et les stratégies de lutte contre le paludisme doivent être adaptées au niveau local.

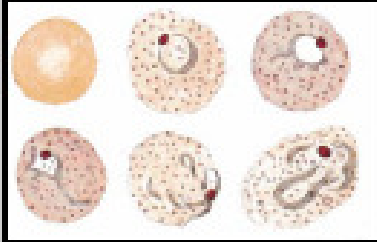
Annexes

Annexe 1 : Planche pour le diagnostic microscopique de *P. vivax*

Plasmodium vivax

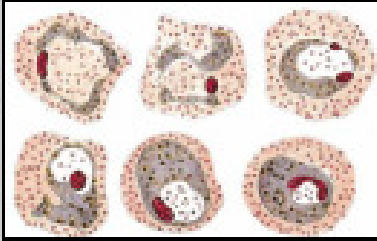
Trophozoïte jeune
Stade fréquent

- + Cytoplasme : anneau bleu assez gros, à contour irrégulier
- + Chromatine : 1 grain rouge, assez gros



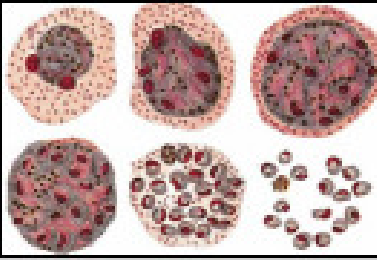
Trophozoïte adulte
Stade peu fréquent

- + Cytoplasme : large tâche bleue, irrégulière (quelque fois divisée en 2, 3 ou 4), avec de petits grains de pigment brun-orange.
- + Chromatine : une tâche rouge



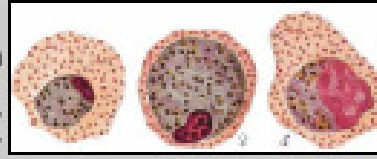
Schizonte
Stade assez fréquent

- + Mérozoïtes : 12 à 18 gros grains rouges compacts, posés sur le cytoplasme bleu pâle



Gamétocyte
Stade fréquent

- + Femelle : ovale ou arrondi, bleu soutenu (femelle) ou clair (mâle)
Noyau triangulaire rouge soutenu, souvent placé à une extrémité; nombreux grains de pigments orange dans le cytoplasme.
- + Mâle : arrondi, bleu clair
Noyau central rond, rouge clair; quelques grains de pigments orange dans le cytoplasme



Hématie

- + Grosses granulations de Schüffner, souvent colorées en rose, surtout autour des trophozoïtes adultes.

Densité parasitaire

- + Moyenne

Annexe 2 : Comparaison de trois méthodes pour le diagnostic du paludisme en zone d'endémie

Am. J. Trop. Med. Hyg., 78(2), 2008, pp. 217–221
Copyright © 2008 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Accuracy and Reliability of Malaria Diagnostic Techniques for Guiding Febrile Outpatient Treatment in Malaria-Endemic Countries

Hanitra Rakotonirina, Céline Barnadas, Rogelin Raheerijafy, Hery Andrianantenaina, Arsène Ratsimbaoa, Laurence Randrianasolo, Martial Jahevitra, Valérie Andriantsoanirina, and Didier Ménard*

Malaria Unit Research and Epidemiology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar

Abstract. The main purpose of this study was to assess the accuracy of various techniques available for diagnosis of malaria. Blood samples were collected from 313 patients with clinical suspicion of uncomplicated malaria in 2 primary health centers in Madagascar. The presence of *Plasmodium* parasites was assessed by conventional microscopy, 2 rapid diagnostic tests (one HRP2-based test, PALUTOP⁺, and one pLDH-based test, OptiMAL-IT), and real-time polymerase chain reaction (PCR), which is used as the “gold standard” method. The degree of agreement observed was very high for microscopy (0.99) and the HRP2-based test (0.93) and high for the pLDH-based test (0.82). Public-health implications are also discussed in this paper.

INTRODUCTION

One main element of global malaria control strategy for effective management is prompt and accurate diagnosis.¹ However, in many endemic countries, such as Madagascar, the current approach to malaria diagnosis, especially in peripheral health centers, is entirely based on clinical diagnosis, which is of limited accuracy due to the poor specificity of symptoms and signs of malaria.^{2–4} Consequently, presumptive antimalarial treatment is widely administered for any fever with no obvious alternative cause, leading to significant overuse of antimalarial drugs, particularly throughout Africa.^{5–7} In addition, overdiagnosis of malaria in the formal healthcare sector often co-exists with underdiagnosis of malaria in the community.⁶

With chloroquine (CQ) and sulfadoxine–pyrimethamine (SP) resistance becoming widespread and more effective but expensive antimalarial medicines, including artemisinin-based combination therapies (ACTs), being used in most African countries,⁸ there is a need to improve the diagnosis of acute febrile illness at various levels of the health care system; this is now a public health priority in Africa, as it would ensure that antimalarial drugs can be targeted to patients who need them.

The general view is that the “gold standard” method for malaria diagnosis is the detection of *Plasmodium* species by microscopic examination of blood films. This method is relatively simple and has low direct costs, but it is labor-intensive, time-consuming, and requires well-trained personnel who can differentiate between the different *Plasmodium* species.⁶ Alternative diagnostic tests for malaria and in particular rapid diagnostic tests (RDTs) have been developed over the past 20 years. These tests are fast, easy to perform, and do not require electricity or specific equipment.^{9–11} They include those based on histidine-rich protein 2 (HRP2) alone or a modified test format of HRP2 and parasite-specific aldolase enzyme (pan-malarial antigen), and those based on parasite lactate dehydrogenase (pLDH). The technical performances of these alternative techniques have already been assessed in various populations and epidemiologic settings. However, the main

limitation of the majority of these studies was that microscopy was used as the “gold standard.”^{10–17}

The main purpose of this study was to assess the accuracy of different available techniques for the diagnosis of malaria, as a first step to improving malaria management at different levels of the health care system in Madagascar, where malaria is endemic. We designed our study to compare conventional microscopy, 2 RDTs (PALUTOP⁺ and OptiMAL-IT tests), and real-time PCR using blood samples of patients with clinical suspicion of uncomplicated malaria.

METHODS

Field study. This prospective study was conducted between March and September, 2006, in 2 primary health centers in rural areas of Tsiroanomandidy on the west foothill areas of the Highlands in Madagascar. Malaria transmission in this area is low and predominantly seasonal. The main vector is *Anopheles funestus*, and the number of infective bites associated with *Plasmodium falciparum* is estimated to be 2.5 per person per year.¹⁸

As part of the surveillance of antimalarial drug resistance in Madagascar, this study was reviewed and approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health and Family Planning of Madagascar (project no. 007-SANPF-2006).

Febrile patients with typical malaria symptoms presenting at the participating health facilities were given full information concerning the trial and invited to participate in the study. Once informed consent had been given, about 3 mL of venous blood was collected from all patients with an axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ or history of fever in the past 24 hours. Pregnant women and patients with signs of severe and complicated falciparum malaria according to the definition given by WHO in 2001¹⁹ were excluded. Blood, freshly collected in an EDTA anti-coagulation tube, was first used by a trained technician to prepare both thick and thin blood films. The blood sample was then given to a second trained technician who performed each of the immunochromatographic tests according to the manufacturers' instructions. The following immunochromatographic tests were included in the study: (i) the OptiMAL-IT test (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Switzerland, www.diamed.com, batch number 46110.85.01, expiration date: February 2007) designed to detect pLDH of both *P. falciparum* and other plasmodia and (ii) the PALUTOP⁺

* Address correspondence to Didier Ménard, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar. E-mail: dmenard@pasteur.mg

test (ALL.DIAG, Strasbourg, France, www.alldiag.com, batch number 91014, expiration date: November 2007) designed to detect *P. falciparum*-specific histidine rich protein-2 (Pf HRP-2), *P. vivax*-specific pLDH, and pan-malaria-specific pLDH. All tests were transported and maintained at the study site at room temperature and were opened just before use to avoid humidity damage. The reader, blind to other tests performed, examined the RDTs independently. An RDT was considered positive when both the internal control and the test band were stained (irrespective of the intensity of the staining). A test was considered negative if only the internal control was visible. The result of an RDT was considered invalid (test failure) if the internal control was not visible. The results of RDTs were reported to the health center physician. Patients with a positive result for the RDT were promptly treated according to National Malaria Policy, with a combination of artesunate and amodiaquine (Arsucam, Sanofi-Aventis, Paris, France).

Laboratory procedures. Blood, freshly collected in EDTA anti-coagulation tubes, and blood films were sent to the Malaria Unit laboratory within 24 hours in a controlled cool box at 4°C. Thick and thin smears were stained with 4% Giemsa for 20 minutes.²⁰ A microscopist who was blind to the results of clinical diagnosis and the other diagnosis tests performed examined the blood films for the presence of parasites and identified the parasite species under a high-quality microscope (HumaScope, Human, Wiesbaden, Germany) with an incandescent light source. Each smear required approximately 20 minutes to read. A minimum of 200 consecutive fields were counted in the thick blood film before a slide was classified as negative. According to the parasite density, parasites in thick blood films were counted against 200 or 500 white blood cells. The parasite density was estimated assuming 8,000 white blood cells/ μ L of blood.^{21,22}

Parasite DNA was extracted from 100 μ L of blood by treatment with 0.1 M NaOH for 3 min at 100°C. The supernatant was collected and treated with 250 μ L of lysis solution (0.1 M Tris-HCl, Triton X-100, 1 M NaCl, 10 \times SDS, 0.5 M EDTA) and 20 mg/mL proteinase K for 1 h at 37°C. It was then extracted twice with phenol/chloroform (1:1). DNA was precipitated with ethanol, resuspended in 100 μ L of distilled water, and stored at -20°C. *Plasmodium* species carriers were detected by real-time PCR, as described by Mangold and others,²³ with a RotorGene 3000 thermocycler (Corbett Life Science, Sydney, Australia) with technicians blind to the results of microscopy and RDT testing. Briefly, each 25- μ L reaction mixture contained 2–5 μ L of sample DNA, 12.5 μ L of qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I No ROX (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium), and 0.6 mM of each primer (PL1473F18, 5'-TAACgAACgAgATCTTAA-3'; and PL1679R18, 5'-gTTCCTCTAAgAAgCTTT-3'). PCR condi-

tions consisted of an initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by amplification for 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C, and 90 s at 65°C, with fluorescence acquisition at the end of each extension step. Amplification was immediately followed by a melting program consisting of 2 min at 95°C, 2 min at 68°C, and a stepwise temperature increase of 0.5°C/s up to 90°C, with fluorescence acquisition at each temperature transition. The fluorescence data were analyzed using F1/F2 settings, which improved the detection of *P. falciparum*, and a cut-off of 40 cycles was used to define *Plasmodium*-positive samples.

Data analysis. Data were entered, processed, and analyzed using EpiInfo software (version 3.3.2, CDC, Atlanta, GA). The χ^2 test was used to compare the performance of the diagnostic methods. *P* values < 0.05 were considered to indicate statistically significant differences.

To assess sensitivity and specificity, results of microscopy and RDT were compared with real-time PCR results. The sensitivity was calculated as the proportion of positive test results obtained among samples scored as containing malaria parasites by real-time PCR; the specificity was calculated as the proportion of negative test results obtained among samples whose real-time PCR results were negative. Positive and negative predictive values were also calculated as the proportion of true-positive or true negative results among all samples scored as positive or negative by PCR, respectively. Kappa (κ) values, expressing the agreement beyond chance, were calculated. A κ value of 0.21–0.60 is a “moderate,” a κ value of 0.61–0.80 a “good,” and a κ value > 0.80 is an almost perfect agreement, beyond chance.²⁴

RESULTS

Patient recruitment. Between March and September 2006, 313 patients, from age 6 months to 79 years (median age = 10.0 years, inter-quartile range 4–24.7 years), were recruited: 29.1% were < 5 years old, 34.3% between 5 and 14 years old, and 36.6% > 15 years old. The male/female ratio was 1.2:1. The mean axillary temperature was 37.8°C (SD \pm 1.0°C, range 36–40.9°C). According to light microscopy, the mean parasite density on the 104 positive samples was 4,041 parasites/ μ L (SD \pm 7,894, range 32–52,750 parasites per microliter). Thirty-four percent of these patients declared that they had taken antimalarial therapy before the current consultation (chloroquine in 70.0%, cotrimoxazole in 20.0%, SP in 3.0%, tetracycline in 3.0%, and quinine in 3.0%).

Real-time PCR results. Real-time PCR results showed that 34.5% (108/313) of these patients were infected with malaria. *P. falciparum* was present in 80.5%, *P. vivax* in 15.8%, and mixed *P. falciparum/P. vivax* in 3.7% of the positive specimens (Table 1).

TABLE 1

Field-study patients positive for *Plasmodium* spp. by real-time PCR, microscopy, PALUTOP⁺, and OptiMAL-IT, Madagascar, March–September 2006

Real-time PCR results	n (%)	Microscopy					PaluTop ⁺					OptiMAL-IT		
		Negative	Pf	Pv	Pm	Pf/Pv	Negative	Pf	Pv	Pm or Pv	Pf/Pv	Negative	Pf	Non-Pf
Negative	205 (65.5)	205	0	0	0	0	199	6	0	0	0	203	1	1
Pf	87 (27.8)	1	86	0	0	0	3	83	0	1	0	19	66	2
Pv	17 (5.4)	2	0	14	1	0	0	1	15	1	0	1	1	15
Pf/Pv	4 (1.3)	1	0	1	0	2	0	0	1	0	3	1	0	3

TABLE 2

Diagnostic performance of PaluTop⁺ and OptiMAL-IT tests relative to that of microscopy according to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* trophozoite densities

Infection type	Malaria diagnostic technique	n	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Mono-infection with <i>P. falciparum</i>	Microscopy	292	98.8 (94.4–99.9)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (96.6–100.0)	99.5 (97.6–99.9)
	PaluTop ⁺	292	95.4 (89.3–98.5)	97.1 (94.0–98.8)	93.3 (86.5–97.2)	98.0 (95.3–99.4)
	OptiMAL-IT	292	75.8 (66.1–84.0)	99.0 (96.8–99.8)	97.1 (90.6–99.5)	90.6 (86.3–93.9)
Mono-infection with non- <i>P. falciparum</i>	Microscopy	222	88.2 (86.2–97.9)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (81.9–100.0)	99.0 (96.8–99.8)
	PaluTop ⁺	222	94.1 (74.2–99.7)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (82.9–100.0)	99.5 (97.5–99.9)
	OptiMAL-IT	226	85.7 (65.9–96.2)	99.5 (97.6–100.0)	94.7 (76.7–99.7)	98.5 (96.1–99.6)
Multi-infection with <i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	Microscopy	209	50.0 (9.4–90.5)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (22.4–100.0)	99.0 (96.8–99.8)
	PaluTop ⁺	209	75.0 (24.2–98.7)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (36.8–100.0)	99.5 (97.5–99.9)

Microscopy. The results of parasite detection by microscopy are shown in Table 1, and diagnostic performances are shown in Table 2.

Briefly, microscopy reported 104 slide-positive cases of malaria (33.2%). Species determination identified 86 slides with a mono-infection of *P. falciparum* ranging from 32 to 52,750 parasites/μL (mean count, 4,130 parasites/μL), 15 slides with a mono-infection of *P. vivax* ranging from 250 to 12,000 parasites/μL (mean count, 3,455 parasites/μL), 1 slide with a mono-infection of *Plasmodium malariae* (1,250 parasites/μL), and 2 slides with multi-infections of *P. falciparum*/*P. vivax* (440/640 and 1,500/7,250 parasites/μL). The *Plasmodium* parasite was not observed in 209 (66.8%) slides.

RDTs. PALUTOP⁺ testing gave the following results: in total, 90 cases were scored *P. falciparum*-positive; 16 cases *P. vivax*-positive; 2 cases *P. malariae*- or *Plasmodium ovale*-positive; and 3 cases both *P. falciparum*- and *P. vivax*-positive. OptiMAL-IT testing gave the following results: in total, 68 cases were scored *P. falciparum*-positive, and 21 cases non-*P. falciparum*-positive (Table 1). Test failures, defined as tests in which the control band did not appear, were not observed with either RDTs.

Diagnostic performances of the two RDTs were evaluated using real-time PCR as the “gold standard” (Table 2); for detection of mono-infection of *P. falciparum* malaria, the PALUTOP⁺ test was significantly more sensitive (95.4% versus 75.8%, $P = 0.0001$) and had a higher NPV (98.0% versus 90.6%, $P = 0.0002$) than the OptiMAL-IT test; for detection of non-*P. falciparum* malaria, the PALUTOP⁺ test

was also significantly more sensitive (94.1% versus 85.7%, $P = 0.005$) and had a higher PPV (100.0% versus 94.7%, $P = 0.0015$) than the OptiMAL-IT test.

The sensitivity of each RDT was compared with that of the microscopy for the detection of both *P. falciparum* and *P. vivax* (Table 3). As expected, both RDTs had lower sensitivity for lower parasitemia. For *Plasmodium falciparum* samples with parasite density < 500 parasites/μL, the PALUTOP⁺ test was significantly more sensitive than the OptiMAL-ITTM test (for parasite density < 100 parasites/μL, $P = 0.008$, and parasite density 100–500 parasites/μL, $P = 0.03$).

Agreement between real-time PCR, microscopy, and RDTs. The performances of the various malaria diagnostic tests were compared (Table 4). With real time PCR, the degree of agreement was very high for microscopy (0.99) and the PALUTOP⁺ test (0.93) and high for the OptiMAL-ITTM test (0.82).

DISCUSSION

In light of changing drug policies in many African countries, where the expensive ACT drugs are now recommended as first-line antimalarial treatment, accurate laboratory confirmation of malaria would obviously be economically beneficial.⁸ We therefore assessed which method is best suited for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries, such as Madagascar. Indeed, diagnosis relying only on clinical signs, as is frequent in Madagascar, always leads to

TABLE 3

Diagnostic performance of PaluTop⁺ and OptiMAL-IT tests relative to that of microscopy according to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* trophozoite densities

Parasite density (trophozoite/μL)	Parasite detection by microscopy					
	n	<i>P. falciparum</i>		n	<i>P. vivax</i>	
		No. positive by PaluTop ⁺ (%)	No. positive by OptiMAL-IT (%)		No. positive by PaluTop ⁺ (%)	No. positive by OptiMAL-IT (%)
< 100	14	11 (78.6)	3 (21.4)	0	N/A	N/A
100–499	9	9 (100)	4 (44.4)	2	2 (100)	2 (100)
500–4,999	45	45 (100)	41 (91.1)	10	10 (100)	8 (80)
> 5,000	18	18 (100)	18 (100)	3	3 (100)	3 (100)

TABLE 4

Agreement for malaria diagnosis between microscopy and RDTs with real-time PCR in 313 blood samples from clinically suspected cases, Madagascar, March–September 2006

κ Value	Microscopy	PaluTop ⁴⁺	OptiMAL-IT
Real-time PCR	0.99	0.93	0.82
Microscopy	—	0.92	0.83
PaluTop ⁴⁺	—	—	0.80

overestimation of the true incidence. We collected blood samples from patients with the clinical symptoms of malaria and analyzed them by microscopy and RDTs and compared the findings to the results real-time PCR used as the “gold standard.”

Overall, we found that microscopy examination performed better than RDTs (HRP2/pan-malarial antigen or pLDH dipsticks) for detecting malaria infections. This observation was consistent with the limit of detection reported in previous studies^{10,25–27}: 5–20 parasites/ μ L for conventional microscopy of Giemsa-stained peripheral blood films versus 100 parasites/ μ L for RDTs based on the detection of HRP-2 or pLDH antigens.^{10,27,28}

Our study also suggests that RDT based on HRP2/*P. vivax*-specific LDH/*Plasmodium*-specific LDH lactate dehydrogenase (PALUTOP⁴⁺) have a better degree of agreement with real time PCR than those based on *P. falciparum*-specific LDH/*Plasmodium*-specific LDH lactate dehydrogenase (OptiMAL-IT). Like the WHO,²⁹ we also observed that the HRP2-based test (PALUTOP⁴⁺ test) was more reliable and accurate than the pLDH-based test (OptiMAL-IT test) for detection of *P. falciparum* or non-*P. falciparum* infections because of (1) its better sensitivity (95.4% versus 75.8% for detection of *P. falciparum* infections and 94.1% versus 85.7%, for detection of non-*P. falciparum* infections) and (2) its low frequency of false negatives (0.96% versus 6.7%, $P = 0.0004$). Moreover, a recent report has shown that performance of malaria RDTs was adversely affected at high ambient temperature, as is prevalent in rural tropical zones, and the pLDH-based RDTs were more susceptible to heat-induced damage than HRP2-based RDTs.³⁰

It is obvious that the choice between HRP2-based RDTs and microscopy, the two best methods for malaria diagnosis, will depend on local circumstances, including available skills, electricity, and laboratory facilities, and also the use of microscopy for the diagnosis of other diseases. In Madagascar, the National Malaria Control Program (NMCP) will promote the improvement of the malaria microscopy in all district hospital settings. Use of RDTs and HRP2-based RDTs should be favored over pLDH-based RDTs,³¹ and should be considered as a means of extending parasite-based diagnosis only to areas where good microscopy cannot be guaranteed or is not available, such as at primary health care facilities or at the community level. Implementing this policy is likely to require a series of laboratory-focused interventions, including making high-quality microscopes available, regular training or re-training of laboratory technicians, strengthening routine supervision, establishing currently non-existent national quality-control systems (microscopy quality control and quality control of RDT batches), team building between laboratory and clinical staff, regular consensus reviews, and surveillance and trend analysis for laboratory-confirmed malaria.

Moreover, in the light of recent reports,^{32–35} significant efforts should be made by policy makers to improve the use of antimalarial treatment in Madagascar: (1) by providing non-ambiguous national guidelines for febrile outpatient treatment in malaria-endemic zones, and especially for treatment of patients with negative tests; and (2) by changing the long-standing malaria diagnostic behavior of clinicians to encourage them to use laboratory results for malaria diagnosis and stop them over-prescribing antimalarial drugs.

Received July 10, 2007. Accepted for publication October 17, 2007.

Acknowledgments: The authors thank the Ministry of Health of Madagascar for allowing us access to malaria patients and the patients for participating in the study.

Financial support: This work was supported by the Global Fund Project for Madagascar, Round 3 (Community Action to Roll Back Malaria, grant no. MDG-304-G05-M).

Authors' addresses: Hanitra Rakotonirina, Céline Barnadas, Rogelin Raherijafy, Hery Andrianantenaina, Martial Jahevitra, Valérie Andriantsoanirina, and Didier Ménard, Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar, Telephone: +261 20 22 412 72, Fax: +261 20 22 415 34, E-mail: dmenard@pasteur.mg, Arsène Ratsimbaoa and Laurence Randrianasolo, Epidemiology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, Antananarivo 101, Madagascar.

REFERENCES

1. World Health Organization, 1993. Implementation of the global malaria control strategy. Report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993–2000. *World Health Organ Tech Rep Ser* 839: 1–57.
2. Chandramohan D, Jaffar S, Greenwood B, 2002. Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. *Trop Med Int Health* 7: 45–52.
3. Kallander K, Nsungwa-Sabiiti J, Peterson S, 2004. Symptom overlap for malaria and pneumonia—policy implications for home management strategies. *Acta Trop* 90: 211–214.
4. Mwangi TW, Mohammed M, Dayo H, Snow RW, Marsh K, 2005. Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Trop Med Int Health* 10: 530–536.
5. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I, 2004. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 364: 1896–1898.
6. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakungula E, Mwerinde O, Saganda K, Shao J, Kitua A, Olomi R, Greenwood BM, Whitty CJ, 2004. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* 329: 1212.
7. Zurovac D, Midia B, Ochola SA, English M, Snow RW, 2006. Microscopy and outpatient malaria case management among older children and adults in Kenya. *Trop Med Int Health* 11: 432–440.
8. Mutabingwa TK, Anthony D, Heller A, Hallett R, Ahmed J, Drakeley C, Greenwood BM, Whitty CJ, 2005. Amodiaquine alone, amodiaquine+sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine+artesunate, and artemether-lumefantrine for outpatient treatment of malaria in Tanzanian children: a four-arm randomised effectiveness trial. *Lancet* 365: 1474–1480.
9. Bell D, Peeling RW, 2006. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nat Rev Microbiol* 4: S34–S38.
10. Moody A, 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 15: 66–78.
11. Wongsrichanalai C, 2001. Rapid diagnostic techniques for malaria control. *Trends Parasitol* 17: 307–309.

12. Beadle C, Long GW, Weiss WR, McElroy PD, Maret SM, Oloo AJ, Hoffman SL, 1994. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 343: 564-568.
13. Cruciani M, Nardi S, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C, 2004. Systematic review of the accuracy of the ParaSight-F test in the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Med Sci Monit* 10: MT81-MT88.
14. Fryauff DJ, Gomez-Saladin E, Purnomo, Sumawinata I, Sutami-hardja MA, Tuti S, Subianto B, Richie TL, 1997. Comparative performance of the ParaSight F test for detection of *Plasmodium falciparum* in malaria-immune and nonimmune populations in Irian Jaya, Indonesia. *Bull World Health Organ* 75: 547-552.
15. Hanscheid T, 1999. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol* 21: 235-245.
16. Mens P, Spieker N, Omar S, Heijnen M, Schallig H, Kager PA, 2007. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. *Trop Med Int Health* 12: 238-244.
17. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C, 2003. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health* 8: 876-883.
18. Robert V, Le Goff G, Andrianaivolambo L, Randimby FM, Domarle O, Randrianarivojosia M, Raharimanga V, Raveloson A, Ravaonjanahary C, Arley F, 2006. Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar. *Int J Parasitol* 36: 1273-1281.
19. World Health Organization, 2001. Monitoring Antimalarial Drug Resistance, Report of WHO Consultation, Geneva, December 3-5, 2001 (WHO/CDS/CSR/EPH/2002.7). Geneva, Switzerland: WHO, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. Available at: http://www.who.int/malaria/cmc_upload/0/000/015/800/200239.pdf.
20. Golvan YJ, Ambroise-Thomas P, 1990. *Les Nouvelles Techniques en Parasitologie*. Paris: Flammarion Medecine Sciences, 134.
21. World Health Organization, 1996. Management of Uncomplicated Malaria and the Use of Antimalarial Drugs for the Protection of Travellers. Report of an Informal Consultation (WHO/MAL/96). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 98.
22. World Health Organization, 2003. Malaria Rapid Diagnosis: Making It Work. Meeting Report [RS/2003/GE/05(PHL)], January 20-23, 2003. Manila: World Health Organization.
23. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RBJ, Peterson LR, Kaul KL, 2005. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol* 43: 2435-2440.
24. Altman DG, 1991. Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Stat Med* 10: 1897-1913.
25. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso ML, Newton CR, 2006. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis* 6: 582-588.
26. Shute GT, 1988. The microscopic diagnosis of malaria. Wernsdorfer WH, McGregor I, eds. *Malaria: Principles and Practices of Malariology*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
27. Singh N, Saxena A, Valecha N, 2000. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection in forest villages of Chhindwara, Central India. *Trop Med Int Health* 5: 765-770.
28. Quintana M, Piper R, Boling HL, Makler M, Sherman C, Gill E, Fernandez E, Martin S, 1998. Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 59: 868-871.
29. World Health Organization, 2005. Interim Notes on Selection of Type of malaria Rapid Diagnostic Test in Relation to the Occurrence of Different Parasite Species. Guidance for National Malaria Control Programmes, August 2005. Geneva, Switzerland: WHO Roll Back Malaria Department.
30. Chiodini PL, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell JW, Grady KK, Luchavez J, Moody AH, Cenizal A, Bell D, 2007. The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 331-337.
31. Ratsimbaoa A, Randriamanantena A, Raherinjafy R, Rasoarilalao N, Menard D, 2007. Which malaria rapid test for Madagascar? Field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 76: 481-485.
32. D'Acremont V, Lengeler C, Genton B, 2007. Stop ambiguous messages on malaria diagnosis. *BMJ* 334: 489.
33. Hamer DH, Ndhlovu M, Zurovac D, Fox M, Yeboah-Antwi K, Chanda P, Sipilinyambe N, Simon JL, Snow RW, 2007. Improved diagnostic testing and malaria treatment practices in Zambia. *JAMA* 297: 2227-2231.
34. Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Mwerinde O, Olomi R, Drakeley C, Whitty CJ, 2007. Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial. *BMJ* 334: 403.
35. Talisuna AO, Meya DN, 2007. Diagnosis and treatment of malaria. *BMJ* 334: 375-376.

Annexe 3 : Polymorphisme des antigènes détectés par les tests rapides pour le diagnostic du paludisme

Article soumis (Malaria Journal)

Country-wide assessment of the genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens detected by Malaria Rapid Diagnostic Tests

Polymorphism in malaria antigens detected by RDTs

Natacha Mariette^{1±}, Céline Barnadas^{1±}, Christiane Bouchier², Magali Tichit², Didier Ménard^{1*}

¹ Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

² Plate-forme Génomique, Institut Pasteur de Paris, Paris, France.

± These authors contributed equally to this work

* Corresponding author

Dr Didier MENARD

Malaria Research Unit

Institut Pasteur de Madagascar

BP 1274 - ANTANANARIVO 101

Tel. (261) 20 22 412 72

Fax (261) 20 22 415 34

E-mail: dmenard@pasteur.mg

Abstract

Background

Rapid diagnostic tests (RDTs) are becoming increasingly indispensable in malaria management, as a means of increasing the accuracy of diagnosis. The WHO has issued recommendations, but RDT selection remains difficult for users in endemic countries. The genetic variability of the antigens detected with RDTs has been little studied but may greatly affect the sensitivity of RDTs. This factor has been studied by comparisons between countries at continental level, but little information is available concerning antigen variability at national level.

Methods

A country-wide assessment of polymorphism of the PfHRP2, PfHRP3, pLDH and aldolase antigens was carried out in 260 *Plasmodium falciparum* and 127 *Plasmodium vivax* isolates, by sequencing the genes encoding these antigens in parasites originating from the various epidemiological strata for malaria in Madagascar.

Results

Higher levels of polymorphism were observed for the PfHRP2 and PfHRP3 antigens than for the *P. falciparum* and *P. vivax* aldolase and pLDH antigens. PfHRP2 sequence analysis predicted that 9% of Malagasy isolates would not be detected at parasite densities ≤ 250 parasites/ μ l (ranging from 6% in the north to 14% in the south), although RDTs based on PfHRP2 detection are now recommended in Madagascar...

Conclusions

These findings highlight the importance of training of health workers and the end users of RDTs, in the provision of information about the possibility of false-negative results for patients with clinical symptoms of malaria, particularly in the south of Madagascar.

Annexe 4 : Prévalence et sensibilité de *Plasmodium malariae* à Madagascar

Am. J. Trop. Med. Hyg., 77(6), 2007, pp. 1039–1042
Copyright © 2007 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Short Report: Prevalence and Chloroquine Sensitivity of *Plasmodium malariae* in Madagascar

Céline Barnadas, Arsène Ratsimbaoa, Hanitra Ranaivosoa, Didier Ralaizandry, Diamondra Raveloariseheno, Vony Rabekotonorina, Stéphane Picot, and Didier Ménard*

Parasitology and Tropical Medicine, University Lyon 1, Lyon, France; Epidemiology Unit, and Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

Abstract. We report the results of clinical studies carried out at six sites in Madagascar, between January and October 2006. The aims were (i) to update our knowledge of the burden of *Plasmodium malariae* infection and (ii) to assess the therapeutic efficacy of chloroquine for uncomplicated quartan malaria. Our findings confirm that *P. malariae* is the third leading cause of malaria, accounting for 1.1% of all malarial infections. They also demonstrate that chloroquine—currently recommended for the home management of presumed malaria in children under the age of five years and commonly used by adults—remains highly effective in patients with uncomplicated *P. malariae* infection.

Plasmodium malariae, one of the four species of *Plasmodium* affecting humans, is found in tropical and subtropical regions, often in sympatry with other *Plasmodium* species, as in Madagascar. Its reported prevalence varies from less than 4% to more than 20% in endemic regions.^{1–4} No accurate estimate of the prevalence of *P. malariae* infection worldwide is currently available, but it has been calculated that there are probably at least 60 million infections per year, based on the prevalence of *P. falciparum*^{5,6} and known underestimation of the prevalence of *P. malariae*.^{7,8} The clinical features associated with febrile bouts of *P. malariae* are generally milder than those caused by other species.⁹ Fever displays quartan (4-day) periodicity, parasite density is usually considerably below 1000 parasites per ml of blood, and infection is rarely life-threatening in the absence of complications, such as nephrotic syndrome.^{10–12}

All four of the main malaria parasites affecting humans are present in Madagascar, a crossroads of African, Indo-Asian, Middle Eastern, and European civilizations. Malaria remains a serious public health problem (e.g., official data reported 1,227,632 cases of suspected malaria in 2005) and the leading cause of morbidity and mortality, especially in children under 5 years of age.^{13–15}

No recent data concerning the prevalence and chloroquine (CQ) sensitivity of *P. malariae* have been published. CQ is the antimalarial treatment recommended by the National Malaria Control Program (NMCP) for the home management of presumed malaria (HMM) in children under 5 years of age. *P. malariae* clearance from the blood is known to take longer than that of other species after chloroquine treatment¹⁶ and two cases of resistance have been documented in south Sumatra, Indonesia.¹⁷

Recent WHO guidelines for the testing of therapeutic efficacy have not yet been applied to *P. malariae* infection. We therefore report here the results of a clinical study carried out at six sites in 2006. The aims of this study were to: (i) update our knowledge of the burden of *Plasmodium malariae* infections and (ii) assess the therapeutic efficacy of CQ for uncomplicated quartan malaria.

This clinical study, approved by the National Ethics Com-

mittee of the Ministry of Health and Family Planning of Madagascar (N° 102-SANPF-2006), was conducted in 2006, at six primary health centers and assessed the therapeutic efficacy of the main antimalarial drugs used in Madagascar. All patients with fever or a history of fever in the 48 h before their arrival at the health center were screened with the rapid diagnostic test (RDT) based on the detection of *Plasmodium*-specific lactate dehydrogenase (pLDH) (OptiMAL-IT™, DiaMed AG®, Cressier sur Morat, Switzerland). Giemsa-stained thin and thick blood films were prepared for each patient with a positive RDT result. A microbiologist differentiated between the different *Plasmodium* species and parasitemia was assessed. Patients with histologically confirmed *P. malariae* infection were enrolled according to inclusion criteria adapted from the WHO guidelines (2001)¹⁸ for *P. vivax* therapeutic efficacy tests. Informed consent was obtained from all adults and from at least one parent for minors. Patients were then treated with the standard chloroquine regimen of 25 mg/kg over 3 days and followed for 28 days. Clinical examination, including axillary temperature recording and the screening of thick and thin films, was carried out on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 28. On these days, capillary blood was spotted onto filter paper for PCR confirmation. Hemoglobin concentration was measured on days 0 and 28.

DNA was extracted from blood spots with Instagene® Matrix resin (BioRad®, Marnes la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. The parasite species was confirmed by real-time PCR, using species-specific primers as described by de Monbrison,¹⁹ with a protocol adapted to the RotorGene® 3000 thermocycler (Corbett Life Science®, Sydney, Australia).

From January to October 2006, 6,692 patients were screened: 66.8% tested negative for malaria. Of the patients whose test results indicated the presence of malaria, 91.9% tested positive for *P. falciparum* and 8.1% for other *Plasmodium* species.

Microscopy results confirmed by species-specific real-time PCR showed that 86.9% of the patients infected with non-*falciparum* species were infected with *P. vivax* and 13.1% were infected with *P. malariae*. None of the patients tested positive for *P. ovale*. *Plasmodium malariae* infection accounted for 0% (Ihoso) to 2.0% (Maevatanana) of all malaria cases, depending on the site considered (Figure 1).

Clinical and parasitological monitoring was complete for all (16 of 16) *P. malariae*-infected patients until day 28. There

* Address correspondence to Didier Ménard, Malaria Research Unit, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274-Antananarivo 101. E-mail: dmenard@pasteur.mg

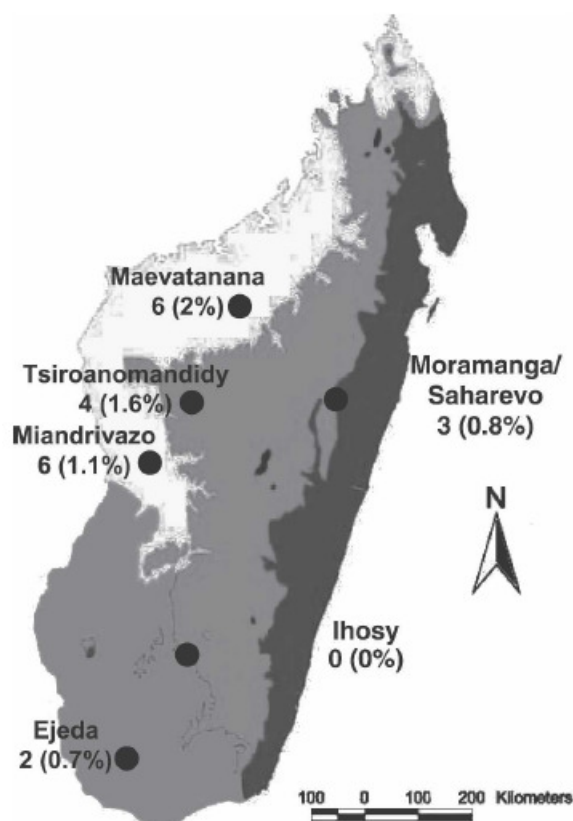


FIGURE 1. Distribution and prevalence of *P. malariae* infections at six sites in Madagascar from January to October 2006.

were six male and 10 female patients (62.5%), aged from 1 to 25 years (median 4.5), with a median weight of 10.5 kg (range 5–63). All patients had had fever during the past 48 hours and none declared having taken antimalarial drugs. Neither microscopy nor real-time PCR showed mixed infections (*P. malariae* with other species). The geometric mean of asexual parasite count was 947/ μ L (range 250–14,000) at baseline.

None of the patients had detectable gametocytes on microscopy at day 0 or during the time of follow-up. Mean hemoglobin concentration was 9.1 g/dL on day 0, and the mean increase in hemoglobin concentration observed on day 28 (mean of individual increases in Hb) was 1.0 g/dL.

Fifteen patients successfully cleared *P. malariae* parasitemia after CQ treatment. One case was excluded on day 28 because *P. falciparum* parasites were detected on a blood smear (confirmed by real-time PCR). Microscopy showed parasite clearance before day 7 in all patients. However, real-time PCR showed parasites to be present in the blood, as described for diagnosis in one patient, and this patient displayed clearance between days 7 and 14 (Figure 2).

Our data confirm that *P. malariae* is the third leading cause of malaria in Madagascar after *P. falciparum* and *P. vivax*. No *P. ovale* parasites were observed due to the very low prevalence of this specie in Madagascar.²⁰ The prevalence of *P. malariae*, estimated at 1.1% of all malaria infections, was higher in the Western and the Central Highlands areas. This prevalence was most probably underestimated by using RDT based on pLDH detection for malaria diagnosis. According to our previous study,²¹ its sensibility was estimated at 88.9–100% for parasitemias between 500 to 5000 non-*P. falciparum* parasites/ μ L and at 50.0% when the number of parasites detected with microscopy falls below 100 parasites/ μ L. Previous studies also reported a heterogeneous distribution of this specie according to season, transmission rate, and location: 1% of malaria infections in Analamiranga (western foothill area of the Highlands)²⁰ to 8.5% in Andasibe (eastern foothill area of the Highlands) and 12.3% at Sainte Marie (island east of the main island of Madagascar).^{22,23}

Our study provides the first demonstration that CQ is highly effective against uncomplicated *P. malariae* infection in Madagascar. Three days of CQ treatment gave a clinical and parasitological cure rate of 100% by day 28 and a mean increase in hemoglobin concentration of 1 g/dl over the study period, whereas CQ is only effective in 55.6% of cases of uncomplicated *P. falciparum* malaria and in 89.7% of *P. vivax* malaria cases.²⁴ The NMCP has revised its treatment policy since December 2005, replacing CQ with artemisinin-based combination therapy (AQ+AS, artesunate plus amodiaquine), with the support of the Global Fund.²⁵ However, ACT treatment is used in only 31 of the 111 health districts in

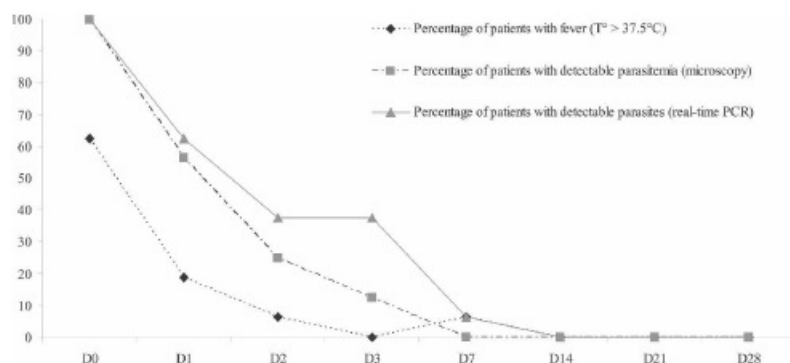


FIGURE 2. Parasites and fever clearance during the 28 days of patient follow-up. Parasite species were distinguished by microscopy and real-time PCR.

Eastern Madagascar. CQ remains the drug most widely available (distribution and financial criteria) and is the first drug used in most of areas in Madagascar, particularly in the pre-packaged PaluStop® form, sold at an affordable price (US \$0.025), or as Ody Tazomoka®, distributed free at primary public health facilities.²⁶ Obviously, with the progressive implementation of the artemisinin-based combination therapy, which is effective in treating malaria infections,²⁷ an approach that does not consider *Plasmodium* species seems to be the most suitable politic treatment at the primary healthcare facilities level in a country where material and human resources to perform a *species*-specific diagnosis are lacking.

In conclusion, our findings demonstrate that oral CQ, which is commonly used, remains highly effective in patients with uncomplicated *P. malariae* infection, the third leading cause of malaria in Madagascar.

Received April 30, 2007. Accepted for publication July 2, 2007.

Acknowledgments: We thank the patients and healthcare workers involved in the national network for the surveillance of malaria resistance in Madagascar (*Réseau d'Etude de la Résistance, RER*) from which these samples were derived, and the staff of the Ministry of Health of Madagascar for their collaboration.

Financial support: This work was supported by a grant from the French Ministry of Foreign Affairs, FSP/RAI 2001-168 project. The collection of samples was supported by funding from the Global Fund project for Madagascar round 3 (Community Action to Roll Back Malaria, Grant number: MDG-304-G05-M).

Disclosure: C. Barnadas is a graduate PhD student supported by the Fondation Jeunesse Internationale (Fondation de France), bioMérieux "Prix bioMérieux infectiologie 2006" and Association des Internes et Anciens Internes en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon "Prix R. Rizard."

Authors' addresses: Céline Barnadas and Stephen Picot, Parasitology and Tropical Medicine, University Lyon 1, Lyon, France. Arsène Ratsimbaoa, Epidemiology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar. Hanitra Ranaivosoa, Didier Ralaizandry, Diamondra Raveloariseheno, Vony Rabekotonorina, and Didier Ménard, Malaria Unit Research, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar.

Reprint requests: Didier Ménard, Malaria Research Unit, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274-Antananarivo 101. E-mail: dmenard@pasteur.mg

REFERENCES

- Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jamme K, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FS, Hayes R, 1987. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 478-486.
- Molineaux L, Storey J, Cohen JE, Thomas A, 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 29: 725-737.
- Smith T, Charlwood JD, Kihonda J, Mwankusye S, Billingsley P, Meuwissen J, Lyimo E, Takken W, Teuscher T, Tanner M, 1993. Absence of seasonal variation in malaria parasitaemia in an area of intense seasonal transmission. *Acta Trop* 54: 55-72.
- Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, Brahimi K, Faye O, Druilhe P, Pereira Da Silva L, 1994. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 51: 123-137.
- Breman JG, Egan A, Keusch GT, 2001. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg* 64: iv-vii.
- Greenwood B, Marsh K, Snow R, 1991. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today* 7: 277-281.
- Kawamoto F, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, 1999. How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? *Parasitol Today* 15: 422-426.
- Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C, Suwonkerd W, Panart K, Prajakwong S, Pensiri A, Kimura M, Matsuoka H, Ferreira MU, Isomura S, Kawamoto F, 1998. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. *Trop Med Int Health* 3: 304-312.
- Werndorfer WH, MacGregor I, 1998. *Malaria: Principles and Practice of Malariology*. London: Churchill Livingstone.
- Abdurrahman MB, Aikhionbare HA, Babaoye FA, Sathiakumar N, Narayana PT, 1990. Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in northern Nigeria. *Q J Med* 75: 563-576.
- Kibukamusoke JW, 1986. The hazard of malarial nephropathy. *Parasitol Today* 2: 119-121.
- Otiemo LS, Mc'Ligeo SO, 1988. Review article: immune nephritides due to malaria. *East Afr Med J* 65: 402-406.
- Institut National de la Statistique de Madagascar, 2002. *Enquête Auprès des Ménages*. Antananarivo: Institut National de la Statistique de Madagascar, 71-83.
- Jeremiah M, Sulhuan A, 2004. Mortalité des enfants de moins de 5 ans à Madagascar. *Enquête Démographique et de la Santé III à Madagascar 2004*: 191-201.
- UNICEF. Multiple Indicator Cluster Survey (MICS), 2000. Available at: <http://www.childinfo.org/MICS2/newreports/madagascar/madagascar.pdf>.
- Collins WE, Jeffery GM, 2002. Extended clearance time after treatment of infections with *Plasmodium malariae* may not be indicative of resistance to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 67: 406-410.
- Maguire JD, Sumawinata IW, Masbar S, Laksana B, Prodjo-dipuro P, Susanti I, Sismadi P, Mahmud N, Bangs MJ, Baird JK, 2002. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonesia. *Lancet* 360: 58-60.
- World Health Organization, 2001. Monitoring Antimalarial Drug Resistance. Report of a WHO consultation (WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17; WHO/CDS/RBM/2002.39). December 3-5, 2001; Geneva, Switzerland.
- de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S, 2003. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 387-390.
- Robert V, Le Goff G, Andrianavolambo L, Randimby FM, Domarle O, Randrianarivelojosa M, Raharimanga V, Raveloson A, Ravaonjanahary C, Ariey F, 2006. Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar. *Int J Parasitol* 36: 1273-1281.
- Ratsimbaoa A, Randriamanantena A, Raheerinjafy R, Rasoarilalao N, Menard D, 2007. Which malaria rapid test for Madagascar? Field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 76: 481-485.
- Lepers JP, Fontenille D, Rason MD, Raharimalala L, Coulanges P, 1990. Malaria in 1989 in a village in the Highland Plateaux of Madagascar. Parasitologic and clinical data obtained in a longitudinal study of a population representative of this region. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 57: 11-52.
- Lepers JP, Rason MD, Raharimalala L, Rabarison P, Rene JP, Coulanges P, 1990. Malaria in the island of Sainte Marie in 1989. Epidemiologic, parasitologic, serologic and clinical data. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 57: 53-74.
- Menard D, Nina Harimanana Andrianina N, Ramiandrasoa Z, Randriamanantena A, Rasoarilalao N, Jahevitra M, Tuseo L,

- Raveloson A, 2007. Randomized clinical trial to assess artemisinin versus non-artemisinin combination therapy for uncomplicated falciparum malaria in Madagascar. *Malar J* 6: 65.
25. Service de Lutte contre le Paludisme, 2005. Politique Nationale de Lutte contre le Paludisme. Ministère de la Santé et du Planning Familial: Antananarivo, Madagascar.
26. Ratsimbaoa A, Randrianarivojosia M, Millet P, Soares JL, Rabarijaona L, Rakotoson B, Malvy D, Menard D, 2006. Use of pre-packaged chloroquine for the home management of presumed malaria in Malagasy children. *Malar J* 5: 79.
27. Tangpukdee N, Thanachartwet V, Krudsood S, Luplertlop N, Pornpininworakij K, Chalermrut K, Phokham S, Kano S, Looareesuwan S, Wilairatana P, 2006. Minor liver profile dysfunctions in *Plasmodium vivax*, *P. malaria* and *P. ovale* patients and normalization after treatment. *Korean J Parasitol* 44: 295-302.

Annexe 5 : Description des sites sentinelles inclus dans le test d'efficacité thérapeutique

D'après Crespy, 2007 [204]

Faciès des hauts plateaux

Tsiroanomandidy (TDD)

Cette ville de 24 885 habitants est située sur les Hautes Terres Centrales au nord-ouest d'Antananarivo (150 km environ) et à environ 1000 mètres d'altitude. La température moyenne annuelle est de 22,5°C et la pluviométrie est de l'ordre de 1616 mm. L'activité agricole est dominée par la riziculture, prépondérante dans la région des Hauts Plateaux. Le niveau de transmission des parasites du paludisme est modéré avec un taux d'inoculation entomologique inférieur à 3 piqûres infestantes par personne et par an. Le pic de transmission se situe entre le mois de mars et le mois de mai. Les infrastructures sanitaires sont plus modestes que celles des autres communes à cause de sa proximité avec la capitale et de la confirmation de Tsiroanomandidy comme métropole sous régionale.

Moramanga

Il s'agit d'une ville de 48 000 habitants environ, situé au nord-est d'Antananarivo (115 km) sur la marge est des Hautes Terres Centrales à 900 m d'altitude. La température annuelle est de 19,4°C et la pluviométrie s'élève à 1504 mm à l'origine de cuvettes marécageuses. La riziculture prédomine les cultures vivrières; le niveau de transmission de *Plasmodium sp.* est similaire à celui observé à Tsiroanomandidy. Le pic de transmission se situe entre mars et mai.

Faciès tropical

Maevatanana

A mi-chemin entre la capitale et Mahajunga, cette ville, d'environ 26 000 habitants, est caractérisée par de larges étendues fertiles qui jouxtent la steppe aride. Le climat est de type tropical sec, à saisons contrastées, chaud pendant sept mois (de novembre à avril) et pluvieuse pendant cinq mois. La température annuelle est de 27°C et la pluviométrie de 1800 mm. La riziculture constitue de loin la principale spéculation de la région en occupant près de 83,2%

des surfaces cultivées vivrières. Le niveau de transmission des parasites est intermédiaire par rapport aux autres sites avec un taux d'inoculation entomologique situé entre 3 et 10 piqûres infestantes par personne et par an.

Miandrivazo

Située sur les bords de la rivière Mahajilo, affluent de la Tsiribihina, Miandrivazo est très encaissée (200 mètres d'altitude). Coincée entre la chaîne du Bongolava à l'Est et le plateau du Bernaraha à l'Ouest, cette situation lui assure le statut de ville la plus chaude de Madagascar avec une moyenne annuelle de 28°C. Sur le plan économique, 72% de surface totale en cultures vivrières sont occupées par la riziculture. Le niveau de transmission de parasites est comparable à celui de Maevatanana.

Faciès du sud

Ejeda

Ejeda, située à 232 km de Tuléar, compte 37 322 habitants et est caractérisée par un climat sub-aride à hiver tempéré, une sécheresse qui dure 7 à 9 mois, une température annuelle moyenne de 24,6 °C et par une pluviométrie annuelle d'environ 580 mm. Dans cette région située dans la zone de plateaux calcaires, les sols sont pauvres et la culture du manioc prédomine celle du riz, celle-ci est relativement faible par rapport aux autres sites. L'état sanitaire est déplorable et la principale maladie est le paludisme grave. Huit variétés d'Anophèles ont été recensées mais uniquement pendant la saison chaude. Cette maladie touche les périmètres irrigués avec 20% de sujets impaludés. La transmission est liée à l'irrigation et le niveau de transmission est variable avec un taux d'inoculation entomologique pouvant atteindre jusqu'à 20 piqûres par personne et par an.

Ihosy

La commune d'Ihosy se trouve au Nord ouest de la région d'Ihorombe située au centre sud de Madagascar. Elle présente une particularité compte tenu de sa position intermédiaire entre les Hautes Terres Centrales et la partie sud de l'île. Elle est caractérisée par un paysage de savanes herbeuses ouvrant les plaines de 300 à 600 mètres d'altitude, par une température moyenne de 20°C et par une pluviométrie comprise entre 700 et 900 mm. Ihosy compte près de 26 000 habitants répartis sur 18 372 km². Les migrations de population peuvent être de différents types selon leur origine, leur durée et leur destination pour cause de transhumance,

ou suite aux famines. Elles peuvent durer quelques mois seulement à des dizaines d'années, mais elles sont souvent définitives. Il faut noter une immigration saisonnière pour la main d'œuvre agricole. La culture vivrière, surtout destinée à l'autoconsommation, occupe une grande partie de la surface cultivée et la culture du riz se pratique largement, notamment durant la saison des pluies. Le paludisme est la principale cause de mortalité dans la région (14,3%) ; en 1999, 18 416 cas de paludisme ont été recensés dans la sous-préfecture d'Ihosy. Le niveau de transmission des parasites est relativement comparable à celui observé à Ejeda.

Annexe 6 : Programmes d'amplification et interprétation des résultats, thermocycleur pour PCR temps réel RotorGene

Amplification des espèces *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* :

- Etapes 1 et 2 : Pre-Incubation

- hold 1 : 50°C, 2 minutes
- hold 2 : 95°C, 10 minutes

- Etape 2 : Amplification

- dénaturation : 95°C, 30 secondes
- hybridation : 56°C, 20 secondes
- élongation : 68°C, 100 secondes ; mesure de la fluorescence à la fin de chaque période d'élongation.

- Etape 3 : Détermination de la température de melting

- 68°C pendant 60 secondes, puis augmentation de la température jusqu'à 90°C, avec un taux de transition de 0,5°C toutes les 5 secondes.

Acquisition permanente de la fluorescence.

- Etape 4 : Refroidissement

- 35°C, 10 minutes.

Amplification de l'espèce *P. malariae* :

- Etapes 1 et 2 : Pre-Incubation

- hold 1 : 50°C, 2 minutes
- hold 2 : 95°C, 10 minutes

- Etape 2 : Amplification

- dénaturation : 95°C, 30 secondes
- hybridation : 56°C, 20 secondes

- élongation : 65°C, 100 secondes ; mesure de la fluorescence à la fin de chaque période d'élongation.

- Etape 3 : Détermination de la température de melting

- 65°C pendant 60 secondes, puis augmentation de la température jusqu'à 90°C, avec un taux de transition de 0,5°C toutes les 5 secondes.

Acquisition permanente de la fluorescence.

- Etape 4 : Refroidissement

- 35°C, 10 minutes.

Interprétation des températures de fusion (T_m) :

Contrôles positifs	Courbe d'amplification	Température de fusion (°C)
<i>P. falciparum</i>	Présence	82 +/- 0.3
<i>P. malariae</i>	Présence	72 +/- 0.3
<i>P. ovale</i>	Présence	78.5 +/- 0.3
<i>P. vivax</i>	Présence	76.5 +/- 0.3

Annexe 7 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvdhfr*

PCR I *pvdhfr* : Amorces d'après Imwong et al., 2003 [205]

PVDHFR PF 5'- ATGGAGGACCTTTCAGATGTATTTGACATT -3'

PVDHFR-PR 5'- GGCGGCCATCTCCATGGTTATTTTATCGTG -3'

Taille du fragment amplifié : **1869 pb.**

PCR II *pvdhfr* : Amorces d'après Imwong et al., 2003 [205]

PVDHFR-NF

5'**CTCGAGGAATTCGGATCC**ATGGAGGACCTTTCAGATGTATTTGACATT -3'

PVDHFR-NR

5'- **TCTAGAAAGCTTGGATCC**CCTTGCTGTAAACCAAAAAGTCCA -3'

Taille du fragment amplifié : **711 pb.**

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvdhfr</i>	PCR II <i>pvdhfr</i>
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	400 µM	200 µM
PVDHFR F (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
PVDHFR R (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvdhfr</i>	PCR II <i>pvdhfr</i>
Dénaturation initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Hybridation	58°C, 30 s	58°C, 30 s
Elongation	72°C, 2 min	72°C, 50 s
Nombre de cycles	45	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 8 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvdhps*

PCR I *pvdhps* : amorces dessinées à l'aide du logiciel Primer-3

PVDHPS PF 5'- ATTCCAGAGTATAAGCACAGC -3'

PVDHPS-PR 5'- GAAACACGCATTATGGTATCG -3'

Taille du fragment amplifié : **1619 pb**.

PCR II *pvdhps* : d'après Korsinczky et al., 2004 [125]

PVDHPS-NF

5'- [CTCGAGGAATTCGGATCCGGTTTATTTGTCGATCCTGTG](#) -3'

PVDHPS-NR

5'- [TCTAGAAAGCTTGGATCCGAGATTACCCTAAGGTTGATGTATC](#) -3'

Taille du fragment amplifié : **1301 pb**.

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvdhps</i>	PCR II <i>pvdhps</i>
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	400 µM	360 µM
PVDHPS F (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
PVDHPS R (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvdhps</i>	PCR II <i>pvdhps</i>
Dénaturation initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Hybridation	50°C, 30 s	50°C, 40 s
Elongation	72°C, 110 s	72°C, 90 s
Nombre de cycles	35	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 9 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvcrt-o*

PCR I *pvcg10* : amorces raccourcies, d'après Nomura et al., 2001 (K6F et VK2B4) [104]

PVCG10-PF 5'- GCTACCCCTAACGCACAATG -3'

PVCG10-PR 5'- GATTTGGGAAAGCACAACGT -3'

Taille du fragment amplifié : **1853 pb**.

PCR II *pvcg10* : amorces dessinées à l'aide du logiciel Primer-3

PVCG10-NF 5'- **CTCGAGGAATTCGGATCC**GATGAACGTTACCGGGAGTTGG -3'

PVCG10-NR 5'- **TCTAGAAAGCTTGGATCC**ATCGGAAGCATCAGGCAGGA -3'

Taille du fragment amplifié : **1707 pb**.

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvcg10</i>	PCR II <i>pvcg10</i>
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	400 µM	360 µM
PVCG10 F (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
PVCG10 R (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvcg10</i>	PCR II <i>pvcg10</i>
Dénaturation initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 4s
Hybridation	56°C, 30 s	60°C, 30 s
Elongation	72°C, 2 min	72°C, 110 s
Nombre de cycles	45	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 10 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvmdr1*

PCR I *pvmdr1* : d'après Sa et al., 2005 [99]

PVMDR1-PF 5' - ATGAAAAAGGATCAAAGGCAAC -3'

PVMDR1-PR 5' - CTA CT TAGCCAGCTTGACGTAC -3'

Taille du fragment amplifié : **4395 pb**.

PCR II *pvmdr1* : amorces dessinées à l'aide du logiciel Primer-3

PVMDR1-NF 5' - **CTCGAGGAATTCGGATCC**TTGAACAAGAAGGGGACGTT -3'

PVMDR1-NR 5' - **TCTAGAAAGCTTGGATCC**CTTATATACGCCGTCCTGCAC -3'

Taille du fragment amplifié : **4290 pb**.

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvmdr1</i>	PCR II <i>pvmdr1</i>
Buffer 10X	1 X	1 X
eau		
25mM MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM
dNTP (2,5mM)	400 µM	410 µM
PVMDR1 F (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
PVMDR1 R (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq TaKaRa LA Taq™

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvmdr1</i>	PCR II <i>pvmdr1</i>
Dénaturation initiale	94°C, 4 min	94°C, 4 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Hybridation	56°C, 30 s	57°C, 30 s
Elongation	72°C, 4 min 30 s	72°C, 4 min
Nombre de cycles	30	35
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 11 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvcsp*

Amorces utilisées : amorces d'après Imwong et al., 2005 [144]

PCR I *pvcsp* :

F-VCS-OF 5'- ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA -3'

R-VCS-OR 5'- TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG -3'

Taille du fragment amplifié : **1112 pb**.

PCR II *pvcsp* :

F-VCS-NF

5'-CTCGAGGAATTCGGATCCGCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAG-3'

R-VCS-NR

5'- TCTAGAAAGCTTGGATCCCAACGGTAGCTCTAACTTTATCTAGGTAT -3'

Taille du fragment amplifié : **700 pb**.

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvcsp</i>	PCR II <i>pvcsp</i>
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	200 µM	360 µM
F-VCS (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
R-VCS (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvcsp</i>	PCR II <i>pvcsp</i>
Dénaturation initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Hybridation	58°C, 40 s	58°C, 40 s
Elongation	72°C, 100 s	72°C, 80 s
Nombre de cycles	40	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 12 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvmsp3α*

Amorces utilisées : amorces d'après Bruce et al., 1999 [206]

PCR I *pvmsp3α*

F-P1 5' - CAGCAGCACCCATTTAAGG -3'

R-P2 5' - CCGTTTGTGATTAGTTGC -3'

Taille du fragment amplifié : **environ 1500, 1900 ou 2300 pb.**

PCR II *pvmsp3α* :

F-N1 5' - **CTCGAGGAATTCGGATCC**GGACCAGTGTGATACCATTAACC -3'

R-N2 5' - **TCTAGAAAGCTTGGATCC**ATACTGGTTCTTCGTCCTTCAGG -3'

Taille du fragment amplifié : **environ 1100, 1400 ou 1900 pb.**

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvmsp3</i>	PCR II <i>pvmsp3</i>
Buffer 10X (25mM MgCl ₂)	1 X	1 X
eau		
dNTP (20mM)	400 μM	360 μM
F-P1 ou F-N1 (10μM)	0,25 μM	0,27 μM
F-P2 ou F-N2 (10μM)	0,25 μM	0,27 μM
Taq * (5U/μL)	1 U	2,5 U

*Taq FirePol[®] DNA Polymerase I, Solis Biodyne

Lors de la 1ère PCR, 2μL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4μL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvmsp3</i>	PCR II <i>pvmsp3</i>
Dénaturation initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Dénaturation	94°C, 40 s	94°C, 40 s
Hybridation	54°C, 40 s	54°C, 40 s
Elongation	72°C, 3 min	72°C, 2 min 30 s
Nombre de cycles	40	45
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Annexe 13 : Amorces et conditions de PCR pour l'amplification du gène *pvmSP1*

PCR I *pvmSP1* : amorces dessinées à l'aide du logiciel Primer-3

PVMSP1-PF 5'- CGAAAATGAAGGCGCTACTC -3'

PVMSP1-PR 5'- CCGTTCGGTCCAAGTACCTA -3'

Taille du fragment amplifié : **5001 pb**.

PCR II *pvmSP1* : amorces dessinées à l'aide du logiciel Primer-3

PVMSP1-NF 5'- **CTCGAGGAATTCGGATCC**ATTGCAAATACCGGAGCAT -3'

PVMSP1-NR 5'- **TCTAGAAAGCTTGGATCC**CCTTTTGGAGGCTATTCAGG -3'

Taille du fragment amplifié : **4200 pb**.

Compositions des mélanges réactionnels pour PCR :

Réactif	PCR I <i>pvmSP1</i>	PCR II <i>pvmSP1</i>
Buffer 10X	1 X	1 X
eau		
25mM MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM
dNTP (2,5mM)	400 µM	410 µM
PVMSP1 F (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
PVMSP1 R (10µM)	0,25 µM	0,27 µM
Taq * (5U/µL)	1 U	2,5 U

*Taq TaKaRa LA TaqTM

Lors de la 1ère PCR, 2µL d'ADN génomique ont été ajoutés au mélange réactionnel. Lors de la PCR nichée, nous avons ajouté 4µL d'amplicon.

Programmes d'amplification utilisés :

	PCR I <i>pvmSP1</i>	PCR II <i>pvmSP1</i>
Dénaturation initiale	94°C, 4 min	94°C, 4 min
Dénaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Hybridation	56°C, 30 s	57°C, 30 s
Elongation	72°C, 5 min	72°C, 4 min 10 s
Nombre de cycles	28	35
Elongation terminale	72°C, 10 min	72°C, 10 min

*Références
bibliographiques*

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW: **The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future.** Lancet Infect Dis 2004, **4**(6):327-336.
2. Breman JG, Alilio MS, Mills A: **Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary.** Am J Trop Med Hyg 2004, **71**(2 Suppl):1-15.
3. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI: **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** Nature 2005, **434**(7030):214-217.
4. Najera JA: **Malaria control: present situation and need for historical research.** Parassitologia 1990, **32**(2):215-229.
5. Armengaud A, Legros F, Quatresous I, Barre H, Valayer P, Fanton Y, D'Ortenzio E, Schaffner F: **A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006.** Euro Surveill 2006, **11**(11):E061116 061113.
6. Mouchet J. CP, Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon, J.: **Biodiversité du paludisme dans le monde.** Paris; 2004.
7. Muller-Stover I, Verweij JJ, Hoppenheit B, Gobels K, Haussinger D, Richter J: ***Plasmodium malariae* infection in spite of previous anti-malarial medication.** Parasitol Res 2007.
8. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R: **The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** Am J Trop Med Hyg 2001, **64**(1-2 Suppl):97-106.
9. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM: ***Vivax* malaria: neglected and not benign.** Am J Trop Med Hyg 2007, **77**(6 Suppl):79-87.
10. Myint HY, Tipmanee P, Nosten F, Day NP, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ: **A systematic overview of published antimalarial drug trials.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2004, **98**(2):73-81.
11. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q: **Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals.** J Infect Dis 2007, **195**(7):934-941.
12. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, Guthmann JP, Nosten F, Carlton J, Looareesuwan S et al: **Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites.** J Infect Dis 2007, **195**(7):927-933.
13. Hulden L, Heliovaara K: **Natural relapses in *vivax* malaria induced by *Anopheles* mosquitoes.** Malar J 2008, **7**(1):64.
14. Craig AA, Kain KC: **Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections.** J Infect Dis 1996, **174**(2):373-379.

15. Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW: **A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites.** Cell 1992, **69**(7):1213-1226.
16. Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nosten F: **The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1996, **90**(2):105-111.
17. Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM: **A retrospective examination of the effect of fever and microgametocyte count on mosquito infection on humans infected with *Plasmodium vivax*.** Am J Trop Med Hyg 2004, **70**(6):638-641.
18. Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R, Mendis KN: **Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria.** Proc Natl Acad Sci U S A 1992, **89**(8):3200-3203.
19. Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC: **Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria.** Trop Med Int Health 2006, **11**(6):817-823.
20. Rogerson SJ, Grau GE, Hunt NH: **The microcirculation in severe malaria.** Microcirculation 2004, **11**(7):559-576.
21. McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE: ***Plasmodium vivax* blood-stage dynamics.** J Parasitol 2002, **88**(3):521-535.
22. Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH: **The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes.** J Exp Med 1996, **184**(4):1531-1536.
23. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C: **Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals.** Nat Genet 1995, **10**(2):224-228.
24. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y: **Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism.** Hum Genet 1995, **95**(4):407-410.
25. Chitnis CE: **Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion.** Curr Opin Hematol 2001, **8**(2):85-91.
26. Cole-Tobian J, King CL: **Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene.** Mol Biochem Parasitol 2003, **127**(2):121-132.
27. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatin BA et al: **Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea.** Proc Natl Acad Sci U S A 1999, **96**(24):13973-13977.

28. Kasehagen LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC, Kazura JW, Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC et al: **Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes.** PLoS ONE 2007, **2**(3):e336.
29. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW et al: **Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya.** Am J Trop Med Hyg 2006, **75**(4):575-581.
30. Rosenberg R: ***Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight?** Trends Parasitol 2007, **23**(5):193-196.
31. Schlagenhauf P: **Malaria in Iraq---the pitfalls of *Plasmodium vivax* prophylaxis.** Lancet Infect Dis 2003, **3**(8):460.
32. Guerra CA, Snow RW, Hay SI: **Mapping the global extent of malaria in 2005.** Trends Parasitol 2006, **22**(8):353-358.
33. Ngimbi NP, Beckers A, Wery M: **[Survey of the epidemiological status of malaria in Kinshasa (Republic of Zaire) in 1980].** Ann Soc Belg Med Trop 1982, **62**(2):121-137.
34. Mengesha T, Gebreselassie H, Mohammed H, Assefa T, Woldemichael T: **Parasight-F dipstick antigen test in the diagnosis of *falciparum* malaria in Ethiopia.** East Afr Med J 1999, **76**(11):626-629.
35. Carme B: **Substantial increase of malaria in inland areas of eastern French Guiana.** Trop Med Int Health 2005, **10**(2):154-159.
36. Carme B, Lecat J, Lefebvre P: **[Malaria in an outbreak zone in Oyapock (French Guiana): incidence of malaria attacks in the American Indian population of Camopi].** Med Trop (Mars) 2005, **65**(2):149-154.
37. Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M: **Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study.** Am J Trop Med Hyg 2004, **70**(3):229-237.
38. Rutar T, Baldomar Salgueiro EJ, Maguire JH: **Introduced *Plasmodium vivax* malaria in a Bolivian community at an elevation of 2,300 meters.** Am J Trop Med Hyg 2004, **70**(1):15-19.
39. Yeom JS, Ryu SH, Oh S, Lee WJ, Kim TS, Kim KH, Kim YA, Ahn SY, Cha JE, Park JW: **Status of *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea during 2001-2003.** Am J Trop Med Hyg 2005, **73**(3):604-608.
40. Park JW, Klein TA, Lee HC, Pacha LA, Ryu SH, Yeom JS, Moon SH, Kim TS, Chai JY, Oh MD et al: ***Vivax malaria*: a continuing health threat to the Republic of Korea.** Am J Trop Med Hyg 2003, **69**(2):159-167.

41. Lim CS, Kim YK, Lee KN, Kim SH, Hoffman KJ, Song KJ, Song JW: **The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax***. Ann Trop Med Parasitol 2001, **95**(3):229-235.
42. Kho WG, Park YH, Chung JY, Kim JP, Hong ST, Lee WJ, Kim TS, Lee JS: **Two new genotypes of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein found in the Republic of Korea**. Korean J Parasitol 1999, **37**(4):265-270.
43. Legros F AA, El Mimouni B, Danis M: **Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001-2004**. BEH 2006, **32**:235-236.
44. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R: **The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria**. Trends Parasitol 2003, **19**(4):188-193.
45. Schofield L, Hackett F: **Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites**. J Exp Med 1993, **177**(1):145-153.
46. Gockel HR, Heidemann J, Lorenz D, Gockel I: **Spontaneous splenic rupture, in tertian malaria**. Infection 2006, **34**(1):43-45.
47. Baird JK: **Neglect of *Plasmodium vivax* malaria**. Trends Parasitol 2007, **23**(11):533-539.
48. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M: **Anemia and thrombocytopenia in children with *Plasmodium vivax* malaria**. J Trop Pediatr 2006, **52**(1):49-51.
49. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Franco-Paredes C: **Is anemia in *Plasmodium vivax* malaria more frequent and severe than in *Plasmodium falciparum*?** Am J Med 2006, **119**(11):e9-10.
50. Kakar A, Bhoi S, Prakash V, Kakar S: **Profound thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria**. Diagn Microbiol Infect Dis 1999, **35**(3):243-244.
51. Kaur D, Wasir V, Gulati S, Bagga A: **Unusual presentation of *Plasmodium vivax* malaria with severe thrombocytopenia and acute renal failure**. J Trop Pediatr 2007, **53**(3):210-212.
52. Makkar RP, Mukhopadhyay S, Monga A, Monga A, Gupta AK: ***Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia**. Braz J Infect Dis 2002, **6**(5):263-265.
53. Martelo OJ, Smoller M, Saladin TA: **Malaria in American soldiers**. Arch Intern Med 1969, **123**(4):383-387.
54. Carlini ME, White AC, Jr., Atmar RL: ***Vivax* malaria complicated by adult respiratory distress syndrome**. Clin Infect Dis 1999, **28**(5):1182-1183.
55. Curlin ME, Barat LM, Walsh DK, Granger DL: **Noncardiogenic pulmonary edema during *vivax* malaria**. Clin Infect Dis 1999, **28**(5):1166-1167.

56. Munteis E, Mellibovsky L, Marquez MA, Minguez S, Vazquez E, Diez A: **Pulmonary involvement in a case of *Plasmodium vivax* malaria.** Chest 1997, **111**(3):834-835.
57. Tanios MA, Kogelman L, McGovern B, Hassoun PM: **Acute respiratory distress syndrome complicating *Plasmodium vivax* malaria.** Crit Care Med 2001, **29**(3):665-667.
58. Anstey NM, Jacups SP, Cain T, Pearson T, Ziesing PJ, Fisher DA, Currie BJ, Marks PJ, Maguire GP: **Pulmonary manifestations of uncomplicated *falciparum* and *vivax* malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity.** J Infect Dis 2002, **185**(9):1326-1334.
59. De Pina JJ, Garnotel E, Hance P, Vedy S, Rogier C, Morillon M: **[Diagnosis of imported malaria in France.].** Med Mal Infect 2007, **37**(11):710-715.
60. Ratsimbaoa A, Randriamanantena A, Raherinjafy R, Rasoarilalao N, Menard D: **Which malaria rapid test for Madagascar? Field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in Madagascar.** Am J Trop Med Hyg 2007, **76**(3):481-485.
61. Rakotonirina H, Barnadas C, Raherijafy R, Andrianantenaina H, Ratsimbaoa A, Randrianasolo L, Jahevitra M, Andriantsoanirina V, Menard D: **Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries.** Am J Trop Med Hyg 2008, **78**(2):217-221.
62. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S: **Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2003, **97**(4):387-390.
63. Pukrittayakamee S, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ: **Therapeutic responses to antimalarial and antibacterial drugs in *vivax* malaria.** Acta Trop 2004, **89**(3):351-356.
64. Bruce MC, Day KP: **Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea.** Trends Parasitol 2003, **19**(6):271-277.
65. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, van Vugt M, Phaipun L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ: **Artesunate/mefloquine treatment of multi-drug resistant *falciparum* malaria.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1997, **91**(5):574-577.
66. Walliker D, Hunt P, Babiker H: **Fitness of drug-resistant malaria parasites.** Acta Trop 2005, **94**(3):251-259.
67. White NJ, Olliaro PL: **Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria.** Parasitol Today 1996, **12**(10):399-401.
68. White NJ: **Drug resistance in malaria.** Br Med Bull 1998, **54**(3):703-715.

69. Grandchamp B: **[A general method for detecting genes that have been recently selected]**. Med Sci (Paris) 2003, **19**(3):273-274.
70. Coatney GR: **Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine**. Am J Trop Med Hyg 1963, **12**:121-128.
71. Baird JK, Leksana B, Masbar S, Fryauff DJ, Sutanihardja MA, Suradi, Wignall FS, Hoffman SL: **Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels**. Am J Trop Med Hyg 1997, **56**(6):621-626.
72. Foley M, Tilley L: **Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents**. Pharmacol Ther 1998, **79**(1):55-87.
73. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC: ***Plasmodium vivax* resistance to chloroquine?** Lancet 1989, **2**(8673):1183-1184.
74. Baird JK, Basri H, Purnomo, Bangs MJ, Subianto B, Patchen LC, Hoffman SL: **Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia**. Am J Trop Med Hyg 1991, **44**(5):547-552.
75. Myat Phone K, Myint O, Myint L, Thaw Z, Kyin Hla A, Nwe Nwe Y: **Emergence of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Myanmar (Burma)**. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993, **87**(6):687.
76. Kshirsagar NA, Gogtay NJ, Rajgor D, Dalvi SS, Wakde M: **An unusual case of multidrug-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Mumbai (Bombay), India**. Ann Trop Med Parasitol 2000, **94**(2):189-190.
77. Fryauff DJ, Tuti S, Mardi A, Masbar S, Patipelohi R, Leksana B, Kain KC, Bangs MJ, Richie TL, Baird JK: **Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in transmigration settlements of West Kalimantan, Indonesia**. Am J Trop Med Hyg 1998, **59**(4):513-518.
78. Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC: **Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America**. Clin Infect Dis 1996, **23**(5):1171-1173.
79. Ruebush TK, 2nd, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, Marquino W, Huilca M, Arevalo E, Garcia C et al: **Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru**. Am J Trop Med Hyg 2003, **69**(5):548-552.
80. Alecrim MdG, Alecrim W, Macedo V: ***Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region**. Rev Soc Bras Med Trop 1999, **32**(1):67-68.
81. Villalobos-Salcedo JM, Tada MS, Kimura E, Menezes MJ, Pereira da Silva LH: **In-vivo sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from Rondônia (western Amazon region, Brazil) to regimens including chloroquine and primaquine**. Ann Trop Med Parasitol 2000, **94**(8):749-758.

82. de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MG, Alecrim WD, Alecrim MG: **Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon.** Emerg Infect Dis 2007, **13**(7):1125-1126.
83. Valibayov A, Abdullayev F, Mammadov S, Gasimov E, Sabatinelli G, Kondrachine AV, Ringwald P: **Clinical efficacy of chloroquine followed by primaquine for *Plasmodium vivax* treatment in Azerbaijan.** Acta Trop 2003, **88**(1):99-102.
84. Baird JK, Caneta-Miguel E, Masbar S, Bustos DG, Abrenica JA, Layawen AV, Calulut JM, Leksana B, Wignall FS: **Survey of resistance to chloroquine of *falciparum* and *vivax* malaria in Palawan, The Philippines.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1996, **90**(4):413-414.
85. Congpuong K, Na-Bangchang K, Thimasarn K, Tasanor U, Wernsdorfer WH: **Sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in Sa Kaeo Province, Thailand.** Acta Trop 2002, **83**(2):117-121.
86. Looareesuwan S, Wilairatana P, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Singhasivanon P, Bussaratid V, Chokjindachai W, Viriyavejakul P, Chalermrut K, Walsh DS et al: **Chloroquine sensitivity of *Plasmodium vivax* in Thailand.** Ann Trop Med Parasitol 1999, **93**(3):225-230.
87. Tan-ariya P, Na-Bangchang K, Tin T, Limpaibul L, Brockelman CR, Karbwang J: **Clinical response and susceptibility *in vitro* of *Plasmodium vivax* to the standard regimen of chloroquine in Thailand.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1995, **89**(4):426-429.
88. Tasanor O, Ruengweerayut R, Sirichaisinthop J, Congpuong K, Wernsdorfer WH, Na-Bangchang K: **Clinical-parasitological response and *in-vitro* sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine and quinine on the western border of Thailand.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2006, **100**(5):410-418.
89. Ratcliff A, Siswantoro H, Kenangalem E, Wuwung M, Brockman A, Edstein MD, Laihadi F, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E et al: **Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2007, **101**(4):351-359.
90. Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA: **Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance.** Mol Pharmacol 1998, **54**(1):170-179.
91. Sanchez CP, Stein W, Lanzer M: **Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.** Biochemistry 2003, **42**(31):9383-9394.
92. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, Sutanto I, Peyron F, Picot S: **Identification of the *Plasmodium vivax mdr*-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity.** J Infect Dis 2005, **191**(2):272-277.

93. Hayward R, Saliba KJ, Kirk K: **The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance.** J Cell Sci 2006, **119**(Pt 6):1016-1025.
94. Geary TG, Divo AD, Jensen JB, Zangwill M, Ginsburg H: **Kinetic modelling of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and its experimental testing *in vitro*. Implications for mechanism of action of and resistance to the drug.** Biochem Pharmacol 1990, **40**(4):685-691.
95. Kuhn Y, Rohrbach P, Lanzer M: **Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin.** Cell Microbiol 2007, **9**(4):1004-1013.
96. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW et al: **Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance.** Mol Cell 2000, **6**(4):861-871.
97. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ: **Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*.** Cell 1989, **57**(6):921-930.
98. Warhurst DC: **A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria.** N Engl J Med 2001, **344**(4):299-302.
99. Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA: ***Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains.** Exp Parasitol 2005, **109**(4):256-259.
100. Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, Prasetyorini B, Piera KA, Barends M, Brockman A et al: **Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax*: In Vitro Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms.** PLoS ONE 2007, **2**(10):e1089.
101. Marfurt J dMF, Brega S, Barbolat L, Müller I, Reeder JC, Beck HP, Picot S, Genton B: **Molecular markers of *in vivo Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*.** J Infect Dis 2008, **198**(3):409-417.
102. Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S: **The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand.** Antimicrob Agents Chemother 1999, **43**(12):2943-2949.
103. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF: ***Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*.** Nature 2000, **403**(6772):906-909.

104. Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, Fidock DA, Su X, Collins WE, McCutchan TF et al: **Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria.** J Infect Dis 2001, **183**(11):1653-1661.
105. Oliver M, Simon F, de Monbrison F, Beavogui AH, Pradines B, Ragot C, Moalic JL, Rapp C, Picot S: [New use of primaquine for malaria.]. Med Mal Infect 2008.
106. Baird JK, Hoffman SL: **Primaquine therapy for malaria.** Clin Infect Dis 2004, **39**(9):1336-1345.
107. Baird JK, Rieckmann KH: **Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?** Trends Parasitol 2003, **19**(3):115-120.
108. Boulard Y, Landau I, Miltgen F, Ellis DS, Peters W: **The chemotherapy of rodent malaria, XXXIV. Causal prophylaxis Part III: Ultrastructural changes induced in exo-erythrocytic schizonts of *Plasmodium yoelii yoelii* by primaquine.** Ann Trop Med Parasitol 1983, **77**(6):555-568.
109. Warhurst DC: **Why are primaquine and other 8-aminoquinolines particularly effective against the mature gametocytes and the hypnozoites of malaria?** Ann Trop Med Parasitol 1984, **78**(2):165.
110. Bray PG, Ward SA, O'Neill PM: **Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history.** Curr Top Microbiol Immunol 2005, **295**:3-38.
111. Egan TJ: **Chloroquine and primaquine: combining old drugs as a new weapon against *falciparum* malaria?** Trends Parasitol 2006, **22**(6):235-237.
112. AFSSAPS: **Médicaments et déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD).** Février 2008.
113. Baird JK, Fryauff DJ, Hoffman SL: **Primaquine for prevention of malaria in travelers.** Clin Infect Dis 2003, **37**(12):1659-1667.
114. Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L, Wirima JJ: **The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi.** Am J Trop Med Hyg 1994, **51**(5):515-522.
115. Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, Peshu N, Marsh K: **Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial.** Lancet 1999, **353**(9153):632-636.
116. Barnes KI, Little F, Mabuza A, Mngomezulu N, Govere J, Durrheim D, Roper C, Watkins B, White NJ: **Increased Gametocytemia after Treatment: An Early Parasitological Indicator of Emerging Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in *Falciparum* Malaria.** J Infect Dis 2008, **197**(11):1605-1613.

117. Darlow B, Vrbova H, Gibney S, Jolley D, Stace J, Alpers M: **Sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of acute malaria in children of Papua New Guinea. II. *Plasmodium vivax***. Am J Trop Med Hyg 1982, **31**(1):10-13.
118. Doberstyn EB, Teerakiartkamjorn C, Andre RG, Phintuyothin P, Noeypatimanondh S: **Treatment of *vivax* malaria with sulfadoxine-pyrimethamine and with pyrimethamine alone**. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979, **73**(1):15-17.
119. Ponnampalan JT, Frank HA: **Treatment of *vivax* malaria with a single dose of sulphadoxine and pyrimethamine (Fansidar)**. Singapore Med J 1983, **24**(2):104-108.
120. Young MD, Burgess RW: **Pyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* malaria**. Bull World Health Organ 1959, **20**(1):27-36.
121. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J: **Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene**. Proc Natl Acad Sci U S A 1987, **84**(23):8360-8364.
122. de Pecoulas PE, Basco LK, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A: **Analysis of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequence**. Gene 1998, **211**(1):177-185.
123. Kongsaree P, Khongsuk P, Leartsakulpanich U, Chitnumsub P, Tarnchompoo B, Walkinshaw MD, Yuthavong Y: **Crystal structure of dihydrofolate reductase from *Plasmodium vivax*: pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance**. Proc Natl Acad Sci U S A 2005, **102**(37):13046-13051.
124. Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Sibley CH: **Antifolates can have a role in the treatment of *Plasmodium vivax***. Trends Parasitol 2007, **23**(5):213-222.
125. Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Rieckmann K, Cheng Q: **Sulfadoxine resistance in *Plasmodium vivax* is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site**. Antimicrob Agents Chemother 2004, **48**(6):2214-2222.
126. Imwong M, Pukrittayakamee S, Cheng Q, Moore C, Looareesuwan S, Snounou G, White NJ, Day NP: **Limited polymorphism in the dihydropteroate synthetase gene (*dhps*) of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand**. Antimicrob Agents Chemother 2005, **49**(10):4393-4395.
127. Auliff A, Wilson DW, Russell B, Gao Q, Chen N, Anh le N, Maguire J, Bell D, O'Neil MT, Cheng Q: **Amino acid mutations in *Plasmodium vivax* DHFR and DHPS from several geographical regions and susceptibility to antifolate drugs**. Am J Trop Med Hyg 2006, **75**(4):617-621.
128. Menegon M, Majori G, Severini C: **Genetic variations of the *Plasmodium vivax* dihydropteroate synthase gene**. Acta Trop 2006, **98**(2):196-199.

129. Tjitra E, Baker J, Suprianto S, Cheng Q, Anstey NM: **Therapeutic efficacies of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine-sulfadoxine-pyrimethamine in vivax malaria pilot studies: relationship to Plasmodium vivax dhfr mutations.** Antimicrob Agents Chemother 2002, **46**(12):3947-3953.
130. Hastings MD, Porter KM, Maguire JD, Susanti I, Kania W, Bangs MJ, Sibley CH, Baird JK: **Dihydrofolate reductase mutations in Plasmodium vivax from Indonesia and therapeutic response to sulfadoxine plus pyrimethamine.** J Infect Dis 2004, **189**(4):744-750.
131. Maguire JD, Krisin, Marwoto H, Richie TL, Fryauff DJ, Baird JK: **Mefloquine is highly efficacious against chloroquine-resistant Plasmodium vivax malaria and Plasmodium falciparum malaria in Papua, Indonesia.** Clin Infect Dis 2006, **42**(8):1067-1072.
132. Baird JK, Basri H, Subianto B, Fryauff DJ, McElroy PD, Leksana B, Richie TL, Masbar S, Wignall FS, Hoffman SL: **Treatment of chloroquine-resistant Plasmodium vivax with chloroquine and primaquine or halofantrine.** J Infect Dis 1995, **171**(6):1678-1682.
133. Lacy MD, Maguire JD, Barcus MJ, Ling J, Bangs MJ, Gramzinski R, Basri H, Sismadi P, Miller GB, Chulay JD et al: **Atovaquone/proguanil therapy for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in Indonesians who lack clinical immunity.** Clin Infect Dis 2002, **35**(9):e92-95.
134. Pukrittayakamee S, Chantira A, Simpson JA, Vanijanonta S, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ: **Therapeutic responses to different antimalarial drugs in vivax malaria.** Antimicrob Agents Chemother 2000, **44**(6):1680-1685.
135. Pukrittayakamee S, Clemens R, Chantira A, Nontprasert A, Luknam T, Looareesuwan S, White NJ: **Therapeutic responses to antibacterial drugs in vivax malaria.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2001, **95**(5):524-528.
136. Hamedi Y, Safa O, Zare S, Tan-ariya P, Kojima S, Looareesuwan S: **Therapeutic efficacy of artesunate in Plasmodium vivax malaria in Thailand.** Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004, **35**(3):570-574.
137. Phan GT, de Vries PJ, Tran BQ, Le HQ, Nguyen NV, Nguyen TV, Heisterkamp SH, Kager PA: **Artemisinin or chloroquine for blood stage Plasmodium vivax malaria in Vietnam.** Trop Med Int Health 2002, **7**(10):858-864.
138. Kolaczinski K, Durrani N, Rahim S, Rowland M: **Sulfadoxine-pyrimethamine plus artesunate compared with chloroquine for the treatment of vivax malaria in areas co-endemic for Plasmodium falciparum and P. vivax: a randomised non-inferiority trial in eastern Afghanistan.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2007, **101**(11):1081-1087.
139. Ratcliff A, Siswantoro H, Kenangalem E, Maristela R, Wuwung RM, Laihad F, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN: **Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant falciparum and vivax malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison.** Lancet 2007, **369**(9563):757-765.

140. Hasugian AR, Purba HL, Kenangalem E, Wuwung RM, Ebsworth EP, Maristela R, Penttinen PM, Laihad F, Anstey NM, Tjitra E et al: **Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria.** Clin Infect Dis 2007, **44**(8):1067-1074.
141. WHO: **Surveillance de la résistance aux antipaludiques.** In: 2001; Geneve: WHO; 2001.
142. Sibley CH, Barnes KI, Plowe CV: **The rationale and plan for creating a World Antimalarial Resistance Network (WARN).** Malar J 2007, **6**:118.
143. MMV: **Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the 17 Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization. 29– 31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands.** 2007.
144. Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G: **Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*.** Malar J 2005, **4**(1):20.
145. Gomez JC, McNamara DT, Bockarie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmerman PA: **Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker.** Am J Trop Med Hyg 2003, **69**(4):377-379.
146. Kosaisavee V, Suwanarusk R, Nosten F, Kyle DE, Barrends M, Jones J, Price R, Russell B, Lek-Uthai U: ***Plasmodium vivax*: isotopic, PicoGreen, and microscopic assays for measuring chloroquine sensitivity in fresh and cryopreserved isolates.** Exp Parasitol 2006, **114**(1):34-39.
147. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, Roepe PD: **Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy.** Antimicrob Agents Chemother 2004, **48**(5):1807-1810.
148. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M: **Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening.** Antimicrob Agents Chemother 2004, **48**(5):1803-1806.
149. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S: **Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates.** Antimicrob Agents Chemother 2007, **51**(4):1172-1178.
150. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M: **Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing.** Antimicrob Agents Chemother 2005, **49**(8):3575-3577.
151. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ: **Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity.** Am J Trop Med Hyg 1993, **48**(6):739-741.

152. Golenda CF, Li J, Rosenberg R: **Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax***. Proc Natl Acad Sci U S A 1997, **94**(13):6786-6791.
153. Tasanor O, Noedl H, Na-Bangchang K, Congpuong K, Sirichaisinthop J, Wernsdorfer WH: **An in vitro system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine**. Acta Trop 2002, **83**(1):49-61.
154. Panichakul T, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Cui L, Udomsangpetch R: **Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax***. Int J Parasitol 2007, **37**(14):1551-1557.
155. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Chierakul W, Newton PN, Ruangveerayuth R, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ: **In vitro efficacy of antimalarial drugs against *Plasmodium vivax* on the western border of Thailand**. Am J Trop Med Hyg 2004, **70**(4):395-397.
156. Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J: **Simple in vitro assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic**. Antimicrob Agents Chemother 2003, **47**(1):170-173.
157. Chotivanich K, Silamut K, Udomsangpetch R, Stepniewska KA, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ: **Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of *Plasmodium vivax***. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001, **95**(6):677-680.
158. de Pecoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco LK: **Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance**. Mol Biochem Parasitol 1998, **92**(2):265-273.
159. Basco LK, Le Bras J: **Short-term in vitro culture of *Plasmodium vivax* and *P. ovale* for drug-susceptibility testing**. Parasitol Res 1994, **80**(3):262-264.
160. Ringwald P, Basco LK: **Comparison of in vivo and in vitro tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaounde, Cameroon**. Bull World Health Organ 1999, **77**(1):34-43.
161. Randrianarivelojosia M, Rakotonjanabelo LA, Mauclere P, Ratsimbaoa A, Raharimalala LA, Arieu F: **[National Network study to perpetuate the surveillance of *Plasmodium falciparum* sensitivity to antimalarials in Madagascar]**. Arch Inst Pasteur Madagascar 2002, **68**(1-2):73-78.
162. Djimde A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV: **Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant falciparum malaria**. Lancet 2001, **358**(9285):890-891.
163. Hastings IM, Korenromp EL, Bloland PB: **The anatomy of a malaria disaster: drug policy choice and mortality in African children**. Lancet Infect Dis 2007, **7**(11):739-748.

164. del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH: **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** Proc Natl Acad Sci U S A 1991, **88**(9):4030-4034.
165. Pacheco MA, Poe AC, Collins WE, Lal AA, Tanabe K, Kariuki SK, Udhayakumar V, Escalante AA: **A comparative study of the genetic diversity of the 42kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*.** Infect Genet Evol 2007, **7**(2):180-187.
166. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Iwasaki T, Kanbara H, Hughes AL: **Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*.** Mol Biochem Parasitol 2006, **146**(1):105-108.
167. Severini C, Menegon M, Gradoni L, Majori G: **Use of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene sequence analysis in the investigation of an introduced malaria case in Italy.** Acta Trop 2002, **84**(2):151-157.
168. Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, Lee KN: **Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates.** Am J Trop Med Hyg 2000, **62**(2):261-265.
169. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S: **Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates.** Mol Biochem Parasitol 1997, **84**(1):49-56.
170. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K: **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus.** Proc Natl Acad Sci U S A 2002, **99**(25):16348-16353.
171. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K: **Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*.** Mol Biochem Parasitol 2000, **109**(2):111-119.
172. Rayner JC, Corredor V, Feldman D, Ingravallo P, Iderabdullah F, Galinski MR, Barnwell JW: **Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3alpha is limited to specific domains.** Parasitology 2002, **125**(Pt 5):393-405.
173. Cui L, Mascorro CN, Fan Q, Rzomp KA, Khuntirat B, Zhou G, Chen H, Yan G, Sattabongkot J: **Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand.** Am J Trop Med Hyg 2003, **68**(5):613-619.
174. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, Walliker D, Day KP: **Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea.** Parasitology 2000, **121** (Pt 3):257-272.

175. Ord R, Polley S, Tami A, Sutherland CJ: **High sequence diversity and evidence of balancing selection in the *Pvmsp3alpha* gene of *Plasmodium vivax* in the Venezuelan Amazon.** Mol Biochem Parasitol 2005, **144**(1):86-93.
176. Leclerc MC, Menegon M, Cligny A, Noyer JL, Mammadov S, Aliyev N, Gasimov E, Majori G, Severini C: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan.** Malar J 2004, **3**:40.
177. Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins WE, Lal AA: **Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite.** Lancet 1993, **341**(8848):780-783.
178. Jarne P, Lagoda P: **Microsatellites, from molecules to populations and back.** TREE 1996, **11**(10):424-429.
179. Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, Severini C, Ayala FJ, Renaud F: **Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*.** Proc Natl Acad Sci U S A 2004, **101**(40):14455-14460.
180. Lim CS, Tazi L, Ayala FJ: ***Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*.** Proc Natl Acad Sci U S A 2005, **102**(43):15523-15528.
181. Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NP, White NJ, Anderson TJ: **Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*.** Mol Biol Evol 2006, **23**(5):1016-1018.
182. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, Kawamoto F, Hartl DL, Wirth DF: **Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*.** Gene 2008, **410**(1):105-112.
183. Russell B, Suwanarusk R, Lek-Uthai U: ***Plasmodium vivax* genetic diversity: microsatellite length matters.** Trends Parasitol 2006, **22**(9):399-401.
184. Paget-McNicol S, Saul A: **Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*.** Parasitology 2001, **122**(Pt 5):497-505.
185. Nair S, Williams JT, Brockman A, Paiphun L, Mayxay M, Newton PN, Guthmann JP, Smithuis FM, Hien TT, White NJ et al: **A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast asian malaria parasites.** Mol Biol Evol 2003, **20**(9):1526-1536.
186. Maiga O, Djimde AA, Hubert V, Renard E, Aubouy A, Kironde F, Nsimba B, Koram K, Doumbo OK, Le Bras J et al: **A shared Asian origin of the triple-mutant dhfr allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa.** J Infect Dis 2007, **196**(1):165-172.
187. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T: **Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria.** Science 2004, **305**(5687):1124.

188. Alam MT, Agarwal R, Sharma YD: **Extensive heterozygosity at four microsatellite loci flanking *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase gene.** Mol Biochem Parasitol 2007, **153**(2):178-185.
189. Hawkins VN, Auliff A, Prajapati SK, Rungsahirunrat K, Hapuarachchi HC, Maestre A, O'Neil MT, Cheng Q, Joshi H, Na-Bangchang K et al: **Multiple origins of resistance-conferring mutations in *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase.** Malar J 2008, **7**(1):72.
190. Marrama L, Rajaonarivelo E, Laventure S, Rabarison P: [***Anopheles funestus* and rice agriculture in the Madagascar highlands**]. Sante 1995, **5**(6):415-419.
191. Ralisoa Randrianasolo BO, Coluzzi M: **Genetical investigations on zoophilic and exophilic *Anopheles arabiensis* from Antananarivo area (Madagascar).** Parassitologia 1987, **29**(1):93-97.
192. Robert V, Le Goff G, Andrianaivolambo L, Randimby FM, Domarle O, Randrianarivojosia M, Raharimanga V, Raveloson A, Ravaonjanahary C, Arieu F: **Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar.** Int J Parasitol 2006, **36**(12):1273-1281.
193. Mouchet J. BS, Rakotonjanabelo A., Ranaivoson G., Rajaonarivelo E., Laventure S., Rossella M. AF: **Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar.** Arch Inst Pasteur Madagascar 1993, **60**:50-59.
194. Randrianarivojosia M, Raharimalala L, Randriamanantena A, Jambou R: [**Drug resistance of *Plasmodium falciparum* in coastal regions of Madagascar**]. Med Trop (Mars) 2000, **60**(3):243-249.
195. Randrianasolo L, Randriamanantena A, Ratsimbaoa A, Rakotoson JD, Randriambeloso J, Raveloson A, Rakotondrajaona N, Tuseo L, Randrianarivojosia M: [**Assessment of sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar, Paludar) efficacy in patients with uncomplicated malaria in Madagascar: preliminary study to propose a simplified study protocol**]. Arch Inst Pasteur Madagascar 2003, **69**(1-2):52-56.
196. Menard D, Ratsimbaoa A, Randrianarivojosia M, Rabarijaona LP, Raharimalala L, Domarle O, Randrianasolo L, Randriamanantena A, Jahevitra M, Andriantsoanirina V et al: **Assessment of the efficacy of antimalarial drugs recommended by the National Malaria Control Programme in Madagascar: up-dated baseline data from randomized and multi-site clinical trials.** Malar J 2008, **7**:55.
197. Rason MA, Andrianantenaina HB, Arieu F, Raveloson A, Domarle O, Randrianarivojosia M: **Prevalent *pfmdr1* n86y mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar despite absence of *pfprt* mutant strains.** Am J Trop Med Hyg 2007, **76**(6):1079-1083.
198. Barnadas C, Ratsimbaoa A, Ranaivosoa H, Ralaizandry D, Raveloariseheno D, Rabekotonorina V, Picot S, Menard D: **Prevalence and Chloroquine Sensitivity of *Plasmodium malariae* in Madagascar.** Am J Trop Med Hyg 2007, **77**(6):1039-1042.

199. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A: **Plasmodium vivax malaria**. Emerg Infect Dis 2005, **11**(1):132-134.
200. Picot S: [Is **Plasmodium vivax** still a paradigm for uncomplicated malaria?]. Med Mal Infect 2006, **36**(8):406-413.
201. Hall T: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucl. Acids. Symp. Ser. **41:95-98**. . 1999.
202. Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, F. B: **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France). . 1996-2004
203. Goudet J: **Fstat (version 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters**. Updated from Goudet [1995]. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2003.
204. Crespy M: **Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement de l'accès palustre simple à Plasmodium vivax**. Th D Pharma, Lyon 1 2007.
205. Imwong M, Pukrittayakamee S, Renia L, Letourneur F, Charlieu JP, Leartsakulpanich U, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G: **Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax: evidence for sequential selection by drug pressure**. Antimicrob Agents Chemother 2003, **47**(5):1514-1521.
206. Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP: **Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of Plasmodium vivax: global and local diversity**. Am J Trop Med Hyg 1999, **61**(4):518-525.