HAL
open science

Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo

Dieudonné Makaba Mvumbi

To cite this version:

Dieudonné Makaba Mvumbi. Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo. Biologie moléculaire. Université de Kinshasa, 2017. Français. NNT : . tel-01476881

HAL Id: tel-01476881

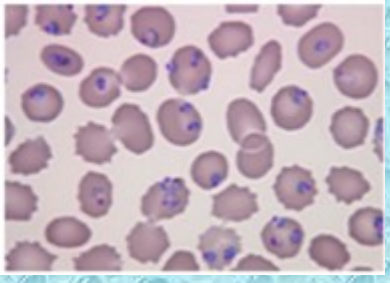
https://theses.hal.science/tel-01476881

Submitted on 14 Mar 2017

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.

Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo



Dieudonné Mvumbi Makaba, **MD, MSc.**

Département des Sciences de Base

Faculté de Médecine

Université de Kinshasa

Thèse soutenue et défendue publiquement en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales (PhD)

Promoteur:

Marie-Pierre Hayette, PhD

Ulg

Co-promoteur:

Jean-Marie Kayembe, PhD

Unikin

Thèse

Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo

Par
Dieudonné Mvumbi Makaba

Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales (PhD)

Le 11 février 2017

Composition du Jury :

1. Professeur Marie-Pierre Hayette, Université de Liège (promoteur)
2. Professeur Jean-Marie Kayembe, Université de Kinshasa (co-promoteur)
3. Professeur Hippolyte Situakibanza, Université de Kinshasa
4. Professeur Gauthier Mesia, Université de Kinshasa
5. Professeur Patrick De Mol, Université de Liège
6. Professeur Dieudonné Mumba, Université de Kinshasa
7. Professeur Prosper Lukusa, Katholieke Universiteit Leuven

Université de Kinshasa

Faculté de Médecine

Département des Sciences de Base

Service de Biologie Moléculaire

Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo

Dieudonné Mvumbi Makaba

Promoteur

Marie-Pierre Hayette, PhD

Co-promoteur

Jean-Marie Kayembe N., PhD

A ma famille …

Table des matières

Liste des figures iii

Liste des tableaux iv

Liste des abréviations v

Remerciements vi

Résumé ix

Introduction……1

Partie I: Etat des connaissances……3

I.1. Le paludisme: de l'antiquité à nos jours……..…… 4

I.2. Des parasites en cause…….……8

I.3.Approche diagnostique……14

I.4. Des molécules antipaludiques……28

I.5. De la résistance aux antipaludiques……...33

I.5.1. Des marqueurs moléculaires de la résistance…...36

I.5.2. Des données disponibles sur la résistance moléculaire aux antipaludiques en RD Congo…….....66

Etude 1: ***Falciparum malaria molecular drug resistance in the Democratic Republic of Congo: a systematic review***…..…..67

Partie II: Du diagnostic et de l'épidémiologie moléculaires du paludisme en RDC…….……75

II.1. Introduction……76

II.2. Objectifs……..80

II.3. Etude 2: ***Comparaison de deux techniques d'extraction d'ADN plasmodial à partir des gouttes épaisses***……..……..…..82

II.4. Etude 3: ***Real-time PCR when using archived thick blood films as source of DNA compared to microscopy for malaria diagnosis in Kinshasa, DR Congo ……88***

II.5. Etude 4: ***High prevalence of falciparum malaria in asymptomatic individuals in Democratic Republic of Congo……...…..98***

II.6. Etude 5: ***Investigation on possible transmission of monkeys' plasmodium to human in a populations living in the equatorial rainforest of the Democratic republic of Congo****……..104*

Partie III : De la chimiorésistance moléculaire de *Plasmodium falciparum* en RDC……..109

III.1. Introduction……110

III.2. Objectifs……112

III.4. Etude 6*:* **Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo**

III.5.Etude7: **Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo……..…121**

Partie IV: Discussion générale et conclusion……..140

Perspectives……149

Références……..……151

Liste des figures

Figure 1. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme de l'OMS

Figure 2. Distribution mondiale du paludisme du milieu du XIXe siècle à 2007

Figure 3.Paludisme versus pauvreté.

Figure 4. Cycle de vie du *Plasmodium* chez l'homme et chez le moustique

Figure 5. Fréquences et distribution des allèles du groupe sanguin Duffy

Figure 6. Distribution spatiale de *P. vivax* en 2010

Figure 7. Phylogénie schématique des plasmodiums des mammifères

Figure 8. Préparation de la goutte épaisse et du frottis mince

Figure 9. QBC malaria tube de chez Woodley laboratory diagnostics

Figure 10. Composition et mécanisme de détection des tests immunochromatographiques pour le paludisme.

Figure 11. Configuration et interprétation des résultats de 2 types de TDR commerciaux

Figure 12. Différentes étapes du processus de la PCR

Figure 13. Agents se liant à l'ADN double brin

Figure 14. Hydrolyse et hybridation de 2 sondes

Figure 15. Représentation schématique de la démarche pour le développement d'une PCR diagnostique

Figure 16. Représentation schématique d'une PCR nichée

Figure 17. Différents types de thermocycleurs

Figure 18. Classification des molécules antipaludiques dérivés quinoléiques

Figure 19: Structure chimique de quelques nouvelles molécules antipaludiques

Figure 20. Chronologie de l'apparition des résistances aux antipaludiques

Figure 21. Apparition et expansion de la chloroquinorésistance

Figure 22. Représentation du chromosome 7 de *P. falciparum*

Figure 23. Localisation du *pfmdr1* sur le chromosome 5 de *P. falciparum*

Figure 24. Distributions des haplotypes *pfcrt*

Figure 25. Mortalité du paludisme dans le monde en 2013

Figure 26. Faciès épidémiologiques du paludisme en Afrique

Figure 27. Proportion des infections dues à *P. falciparum* en RDC

Figure 28. Stratification de la RDC selon le taux de prévalence parasitaire

Liste des tableaux

Tableau 1. Vision de l'OMS d'ici l'an 2030

Tableau 2 : Gènes impliqués dans la résistance de *P. falciparum*

Liste des abréviations

ADN: Acide desoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ASAQ: Artésunate-Amodiaquine

CTA : Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine

EDS: Enquête démographique et sanitaire

GE : Goutte épaisse

HRP-2: Histidine rich protein 2

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

OMS: Organisation mondiale de la santé

PCR: Polymerase chain reaction

Pfcrt : *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

Pfdhfr : *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase

Pfdhps : *Plasmodium falciparum dihydropteroate synthetase*

Pfmdr1: *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

PNLP : Programme national de lutte contre le paludisme

RDC: République Démocratique du Congo

SNIS: Système national d'informations sanitaires

SP: Sulfadoxine-pyriméthamine

TDR: Test de diagnostic rapide

WWARN: Worldwide antimalarial resistance network

Remerciements

Avant toute chose j'aimerai témoigner ma reconnaissance aux diverses personnes, qui par leur soutien et leur apport, ont permis la concrétisation de ce travail. Il nous faut ici les remercier.

Premièrement je tiens à remercier les professeurs Jean-Marie Kayembe et Marie-Pierre Hayette pour avoir accepé de co-diriger ce travail.

Merci particulièrement au professeur Jean-Marie Kayembe car en dépit de ses multiples tâches et responsabilités tant cliniques qu'académiques, il a toujours trouvé du temps à me consacrer pour discuter de cette thèse avec bonne humeur. Vous avez été un modèle pour moi jadis, vous l'êtes encore aujourd'hui et vous le demeurerez longtemps encore !

Je remercie également de manière particulière le Professeur Marie-Pierre Hayette pour son accueil chaleureux dans le Service de Microbiologie Clinique du CHU de Liège, où grâce à elle je ne m'y suis à aucun moment senti comme un étranger. Bien au contraire ! Votre grande sympathie associée à vos qualités scientifiques remarquables demeureront un exemple à vie à mes yeux.

Merci à vous deux pour avoir disponibilisé de votre temps, pour avoir manifesté beaucoup de patience à mon égard et surtout pour votre encadrement qui fait de moi ce jour un meilleur « scientifique » que je ne l'étais hier.

Ma reconnaissance est dirigée vers le Professeur Patrick De Mol, réel inspirateur de cette thèse, qui en coulisse ou de visu a toujours été de bon conseil. La pertinence de vos remarques et de vos orientations raisonneront encore longtemps dans mon esprit.

Je ne peux omettre de citer les professeurs du Département des Sciences de Base, encadreurs proches et du quotidien, ainsi que les autres membres du corps

scientifique de notre cher Département qui ont vu germer ce travail de sa conception jusqu'à son terme. C'est grâce aux échanges répétés de tous les jours avec vous tous que ce travail a pu prendre forme et ainsi se matérialiser. Je pense aux Professeurs Richard Kalala, Baudoin Buassa, Georges Mvumbi, Francis Nsimba, Pius Kabututu, Tite Mikobi, Eric Kamangu ainsi qu'aux chefs de travaux Nathalie Nseka, Koy Deume, Jackin Kambale, Nonga Bolenketa et aux assistants Doudou Yobi, Vicento Diabeno et aux autres que je ne saurai tous énumérer ici.

Ma reconnaissance va également à mes Maîtres de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa, qui à chaque niveau de mon cursus académique, m'ont gratifiés de leurs conseils et remarques m'ayant permis d'acquérir les compétences suffisantes afin d'exécuter et de rédiger ce travail. Je me permet de citer ici quelques uns d'entre eux: Professeurs Hipolyte Situakibanza, Gauthier Mesia, Célestin Nsibu, Emile Okitolonda, Désiré Mashinda, Ernest Sumaili, Dieudonné Mumba, Gilbert Mananga.

A tous les collègues et collaborateurs du CHU de Liège qui m'ont si gentiment « adopté » je dis également un grand merci. Je pense ici spécialement à Raphael Boreux, Laetitia Levaux, Julie Descy, Cécile Meex, Sébastien Bontemps, Rosalie Sacheli, Pascale Huynen, Marie Wéry, Rajae Darfouf, Marie-Christine Lhote, Pierrette Melin etc…. Ca été un réel plaisir de faire toutes ces « Lee » et ces « Cnops » à vos côtés !

A mes formidables et extraordinaires parents, les professeurs Georges Mvumbi Lelo et Astride Lina Piripiri de la faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa, je ne vous dirai jamais suffisamment « Merci » ; car c'est grâce à vous qu'il a très tôt été imprégné en moi le désir d'intégrer le monde scientifique. Vous avez été des Maîtres à domicile, des endadreurs, et de très bons conseillers.

Je ne me lasserai jamais de vous écouter et de suivre vos conseils. Cette thèse est aussi la vôtre ! On y est !!

A Patrick Mvumbi, Bibiche Mvumbi et Nancy Mvumbi, mon frère et mes sœurs, vous m'avez toujours soutenu de mille et une façons. Que cet amour qui nous unit vive à jamais !

A Clori Ingele, mon épouse et Kayla Mvumbi notre fille, vous avez certainement été les premières personnes à consentir de lourds sacrifices et à sentir le poids de cette thèse. Merci d'avoir apaisé mes tensions, de m'avoir fait sourir quand le moral n'y était pas et d'avoir supporté mes humeurs dans mes moments grincheux. Je vous dis merci pour votre amour ainsi que votre patience. J'ai beaucoup de chance de vous avoir…

Je ne saurai finir sans remercier l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES), anciennement appelée CUD, pour le financement de ce doctorat !

Résumé

Des progrès majeurs ont été accomplis dans presque toutes les sciences médicales ces deux dernières décennies grâce à l'essor et surtout à la vulgarisation des techniques de biologie moléculaire dans le monde.

Dans la présente thèse, nous avons voulu explorer l'impact de l'utilisation de cette discipline pour certains aspects du paludisme à savoir le diagnostic, l'épidémiologie ainsi que l'évaluation de la chimiosensibilité du *Plasmodium falciparum*, agent responsable de cette pathologie.

Pour ce faire, 7 études ont été réalisées, regroupées en deux parties distinctes.

Dans la première partie, consacrée au diagnostic et à l'épidémiologie moléculaire du paludisme en République Démocratique du Congo (RDC), nous avons réalisés 4 travaux afin de répondre à des objectifs propres. La première étude décrit la mise au point au laboratoire d'une technique d'extraction d'ADN plasmodial à partir des gouttes épaisses, en remplacement au sang total liquide ou séché sur du papier-filtre généralement employé. La seconde reprend l'application de cette technique dans une situation réelle sur des échantillons collectés en milieu hospitalier et la comparaison d'un diagnostic par PCR en temps réel versus par microscopie conventionnelle. La troisième étude de cette première partie concerne l'utilisation de ce diagnostic moléculaire d'infections à *Plasmodium* pour évaluer la prévalence du portage plasmodial chez des sujets asymptomatiques. Finalement, pour la 4è étude, toujours à l'aide d'une PCR en temps réel diagnostique, nous avons investigué dans une contrée de la RDC la possibilité de transmission à l'humain de *Plasmodium* simiens.

Dans la seconde partie, l'exploration des marqueurs moléculaires de résistance nous a servi pour l'évaluation de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques utilisés en RDC. La première étude de cette partie a analysé deux

marqueurs sur le gène Pfcrt en rapport avec la résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine sur des échantillons collectés dans la ville de Kinshasa. Pour la seconde étude, deux autres gènes ont été analysés en plus : le pfmdr1 et le K13, et cette fois-ci l'étude a été étendue à six aires géographiques à travers la RDC, en tenant compte de ses différents faciès épidémiologiques.

Ces différents travaux nous ont permis de souligner certains avantages non négligeables qu'offrait l'utilisation des techniques moléculaires dans le paludisme, à savoir : un diagnostic des milliers de fois plus sensible que les méthodes conventionnelles permettant de déceler tant des infections sub-microscopiques que des infections mixtes ainsi que de mettre en évidence la forte prévalence des porteurs asymptomatiques. A cela nous pouvons ajouter une évaluation beaucoup plus rapide de la sensibilité des souches de *Plasmodium* circulantes et la possibilité de le faire simultanément pour plusieurs antipaludiques.

Néanmoins, les coûts globaux de réalisation des analyses moléculaires demeurent à ce jour relativement élevés. Ce qui rend l'usage de ces techniques dans la routine presqu'impossible, surtout dans les pays en voie de développement comme la RDC. Des efforts conjugués de la part des gouvernements, des instituts de recherches et des universités pourraient dans un avenir proche permettre un plus grand recours à cette discipline.

INTRODUCTION

Avec près de 200 millions de cas recensés annuellement dans le monde, le paludisme représente un des plus grands problèmes de santé actuels. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le classe parmi les pathologies prioritaires en termes d'intervention, avec la tuberculose et le VIH/SIDA.

La République Démocratique du Congo (RDC) est actuellement le second pays le plus touché par le paludisme en Afrique. Les mesures visant à contrôler le paludisme ne peuvent être efficaces que si elles reposent sur des données globales, fiables et actualisées.

L'amélioration des connaissances sur le paludisme en RDC permettra d'orienter les interventions de manière tant réfléchie qu'objective. La prévalence du paludisme dans la population, la distribution des espèces plasmodiales, l'efficacité des molécules antipaludiques, l'acceptation, l'utilisation et l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides à large durée d'action par les populations, la dissémination ou l'apparition de nouvelles souches chimiorésistances, etc…ne sont que quelques indicateurs très utiles parmi d'autres servant de justificatifs pour l'orientation des interventions visant à réduire la morbi-mortalité liée au paludisme en RDC.

Le présent travail a donc été réalisé en vue de mettre à jour les connaissances sur certains aspects du paludisme en RDC (diagnostic, épidémiologie et chimiosensibilité moléculaire) tout en utilisant des méthodes moléculaires.

Cette rédaction repose donc sur sept études, déjà publiées ou en soumission, regroupées en 2 volets: un premier traitant du diagnostic et de l'épidémiologie moléculaires et un second se rapportant à la chimiorésistance de *P. falciparum* aux antipaludiques utilisés en RDC, explorée sur base des marqueurs moléculaires.

En rapport avec ces 2 volets, des objectifs propres ont été définis et une discussion générale a été formulée.

En regard de la stratégie adoptée par l'OMS pour la lutte contre le paludisme pour la période allant de 2016 à 2030, cette thèse s'est focalisée sur le premier pilier interventionnel, plus particulièrement sur l'axe consacré au diagnostic et au traitement médicamenteux.

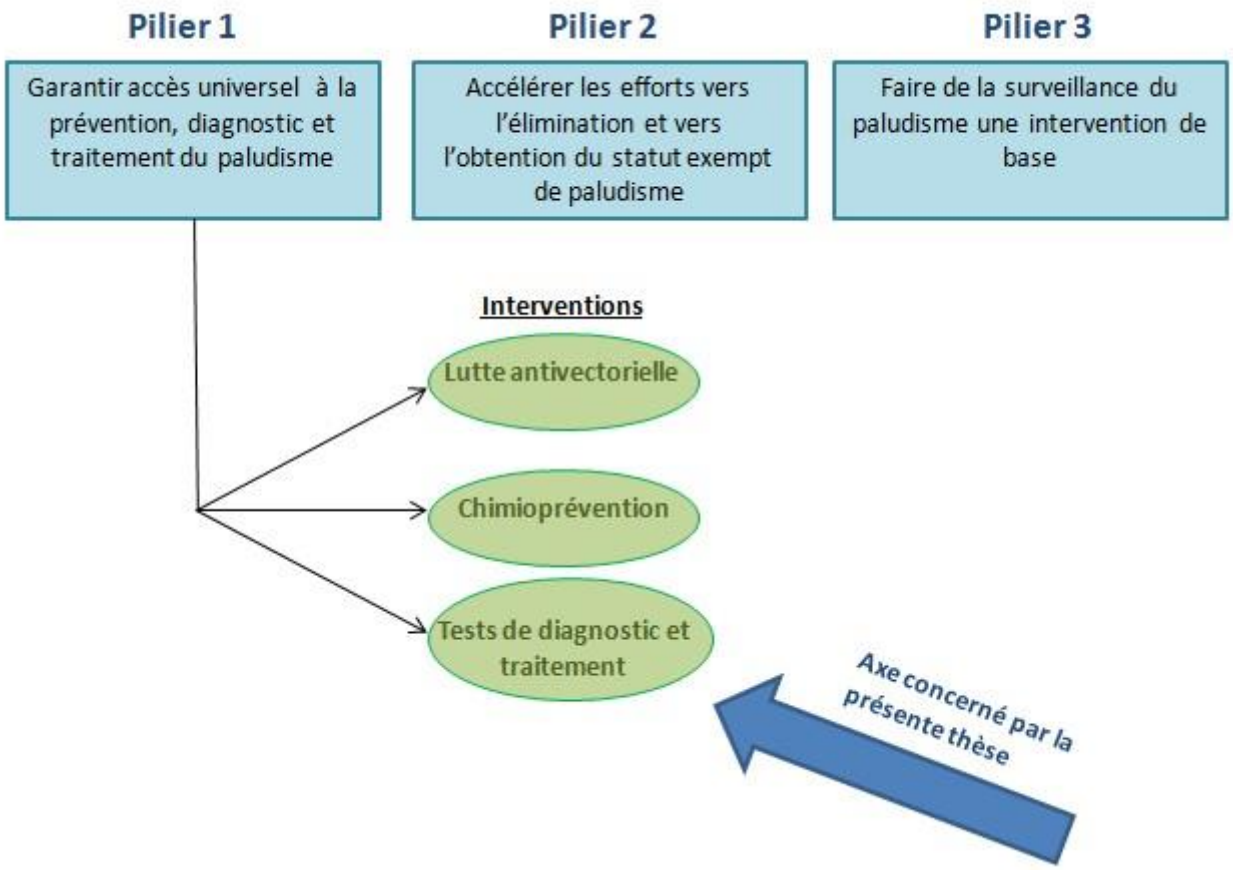


Figure 1: Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme de l'OMS

Partie I:

Etat des connaissances

I.1. Le paludisme: de l'antiquité à nos jours

Les premières allusions au paludisme, aussi appelé “malaria” (en rapport avec le mauvais air auquel il était attribué) remontent à l’antiquité. Ces allusions antiques se rapportent de manière générale à des affections fébriles expliquées alors par diverses étiologies mais pouvant être assimilées au paludisme. C’est ainsi que dans le Huang Nei Jing (黄帝内经), qui est le plus ancien traité de médecine chinoise connu (environ 2700 av J-C), l’on retrouve une description assez précise des symptômes du paludisme (fièvres cycliques et splénomégalie) [1]. De même, dans le *Charaka Samhita*, un texte médical indien du 3è siècle av J-C, il est mention de fièvres qui y sont classifiées en 5 catégories: continue (*samatah*), rémittente (*satatah*), quotidienne (*anyedyuskah*), tierce (*trtiyakah*) et quarte (*caturthakah*) et aussi dans le Susruta Samhita (un autre texte indien du 1er siècle av J-C) qui établissait déjà un lien entre fièvre et piqûres d’insectes [2].

Des preuves plus scientifiques ont été récemment fournies quant à la présence du paludisme dans l'Egypte antique. En effet en 2010, Hawass et al. ont rapporté dans leurs travaux avoir identifié dans des échantillons tissulaires prélevés sur quatre momies de la famille royale d’Egypte antique (dont celle du roi Toutankhamon, né vers -1345, mort vers -1327) les gènes STEVOR, AMA1 et MSP1, spécifiques au *Plasmodium falciparum*, un des agents causaux de cette pathologie [3].

Le paludisme a donc sévit dans presque toutes les régions du globe contrairement à actuellement où il n’est plus présent qu’autour de la ceinture intertropicale, essentiellement d’Asie, d’Afrique et d’Amérique. Jusqu'avant la seconde moitié du 19è siècle, il est estimé qu'environ 90% de la population mondiale vivait en zone impaludée [4].

Vers la moitié du siècle passé (1955), l'OMS lança le Programme Global d'Eradication du paludisme, encouragée par les bons résultats obtenus par l'usage du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) [5], un produit chimique dont la découverte des propriétés insecticides a valu le Prix Nobel de Médecine à Paul Hermann Müller en 1948 [6]. Mais il est vite apparu que l'éradication du paludisme, définie comme « la réduction à zéro, de façon permanente de l'incidence mondiale de l'infection à Plasmodia, résultant d'efforts délibérés, de sorte que des mesures d'intervention ne soient plus nécessaires » [7], était irréalisable avec les moyens disponibles et l'« éradication » fut reformulée en "contrôle" du paludisme, considérée par la 22è assemblée mondiale de la santé comme étape nécessaire et valable vers le but ultime que demeurait l'éradication [8].

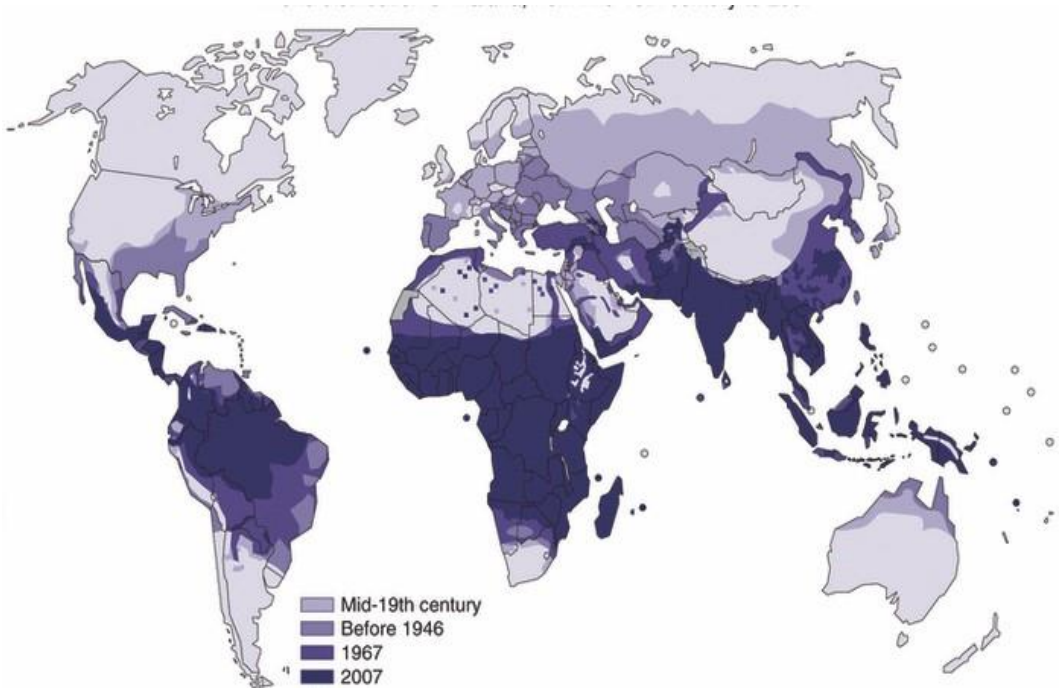


Figure 2 : Distribution mondiale du paludisme du milieu du XIXe siècle à 2007 (de Mendis K. et al. Trop Med Int Health. 2009; 14:802-9)

Néanmoins 37 sur 143 pays endémiques d'alors répartis en Europe, en Amérique du Nord, aux Caraïbes et de certains coins de l'Asie et du sud de l'Amérique centrale, réussirent à éradiquer le paludisme grâce à cette campagne [9]. Malheureusement, ces succès n'ont pas été réalisés en Afrique car un comité d'experts de l'OMS avait établi que les programmes d'éradication ne pouvaient démarrer que dans les pays où il était possible d'obtenir et de maintenir l'interruption de la transmission du paludisme dans toutes les éventualités épidémiologiques. Or, ces conditions n'étaient pas réalisées en Afrique [10].

De nos jours, les régions tempérées, ne connaissent plus que des cas de paludisme dits d'importation, définis comme «une infection acquise dans une zone endémique par un individu (touriste ou natif indigène) mais diagnostiquée dans un pays non-endémique après développement des signes cliniques » [11].

L'urbanisation, l'assainissement ainsi que les campagnes de pulvérisations d'insecticides semblent avoir beaucoup contribué à son élimination dans ces régions. Il est à noter par ailleurs que la majorité des cas de paludisme d'importation recensés en Europe proviennent essentiellement d'Afrique [12-16].

Dans son rapport annuel pour l'année 2015, l'OMS a rapporté 214 million de cas (149–303 million) parmi lesquels 438 .000 (236.000 – 635.000) décès dont 90% survenus dans la région Afrique de l'OMS [17].

La distribution du paludisme est dépendante des conditions écologiques favorables à la survie du moustique vecteur du parasite et cette distribution correspond étroitement, bien malheureusement, aux régions pauvres de la planète, comme illustré dans la figure 3.

En 2015 l'OMS a édité une stratégie technique mondiale pour le quinquennat 2016-2030. Dans ce document, il est décrit la vision de l'OMS qui est celle d'un monde sans paludisme, basée sur une stratégie dont les buts mondiaux sont ambitieux mais atteignables en 2030 via des objectifs intermédiaires aux années 2020 et 2025 [18]. Ces différents objectifs sont repris dans le tableau 1 ainsi que leurs cibles.

Tableau 1: Vision de l'OMS d'ici l'an 2030

BUTS	OBJECTIFS INTERMÉDIAIRES		CIBLES
	2020	2025	2030
1. Réduire les taux de mortalité liée au paludisme au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40 %	Au moins 75 %	Au moins 90 %
2. Réduire l'incidence du paludisme au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40 %	Au moins 75 %	Au moins 90 %
3. Éliminer le paludisme des pays où il y avait transmission en 2015	Au moins 10 pays	Au moins 20 pays	Au moins 35 pays
4. Empêcher la réapparition du paludisme dans tous les pays exempts	Réapparition évitée	Réapparition évitée	Réapparition évitée

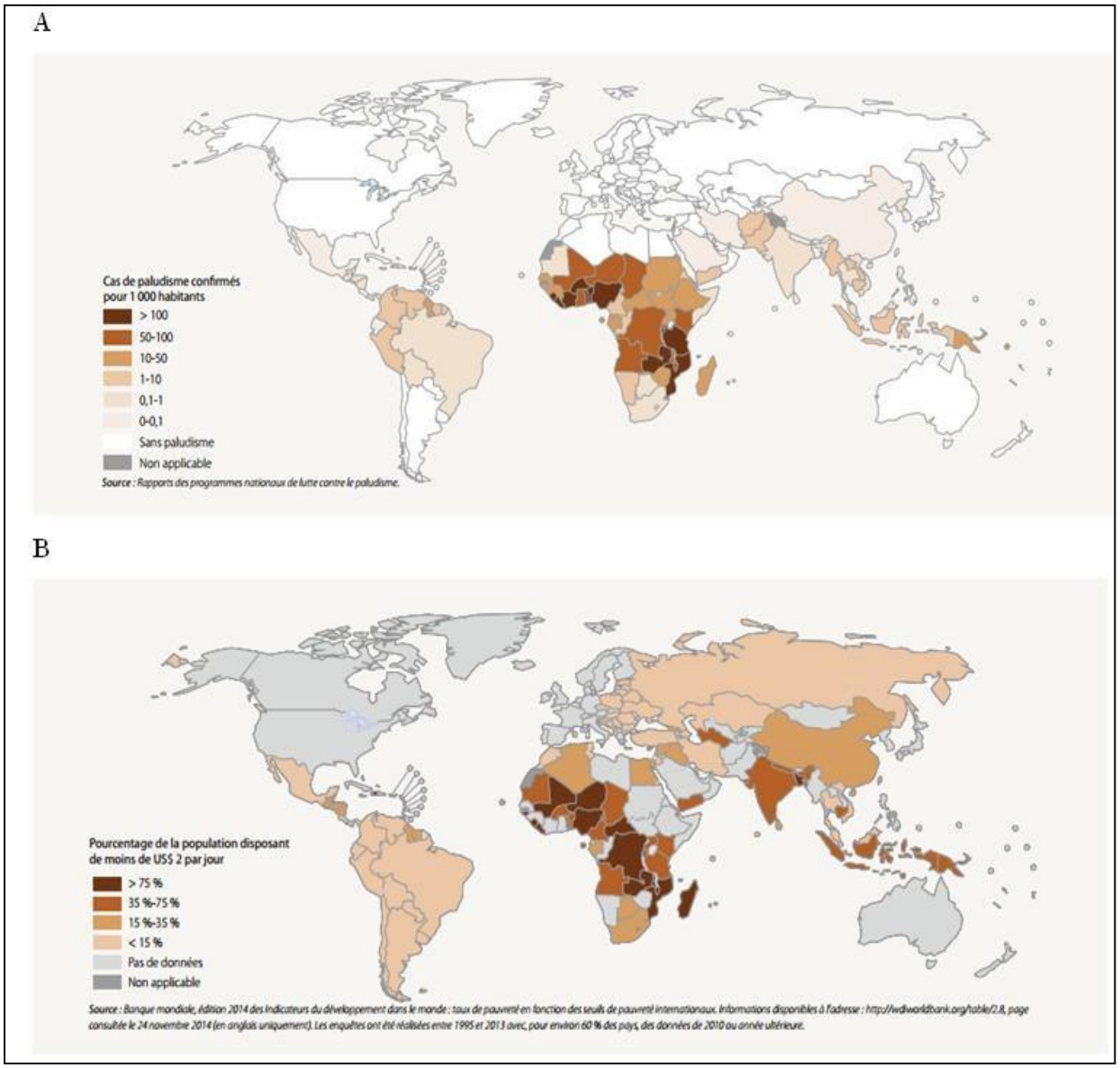


Figure 3: Paludisme versus pauvreté. A. Pays où la transmission du paludisme est active en 2013 B. Pourcentage de la population disposant de moins de 2$ USD par jour pour la période 1995-2013.(Adapté des rapports des programmes nationaux de lutte contre le paludisme ainsi que du rapport de la Banque Mondiale sur les indicateurs du développement, 2014)

I.2. Des parasites en cause

Le paludisme est dû à l'introduction dans l'organisme humain d'un parasite du genre Plasmodium (l'Embranchement des *Apicomplexa*, Classe des

Aconoidasida, Ordre *des Haemosporida et* Famille des *Plasmodiidae)* [19] par un moustique femelle du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin.

C'est en 1880 que le médecin français Charles Louis Alphonse Laveran décrivit pour la première fois l'espèce *Plasmodium falciparum* dans le sang de patients impaludés et communiqua ses observations dans son opuscule intitulé *« Nature parasitaire des accidents de l 'impaludisme : description d 'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre »* [20]. Dix-sept années plus tard (1897), Sir Ronald Ross, médecin britannique, démontra la présence d'une espèce de plasmodium (*Plasmodium relictum,* parasite d'oiseaux) dans l'estomac de moustiques anophèles, soulignant ainsi leur rôle dans la transmission du parasite à l'homme. Ces deux chercheurs reçurent chacun, en reconnaissance de leurs travaux sur le paludisme, le Prix Nobel de Médecine ou Physiologie en 1902 (Ronald Ross) et en 1907 (Alphonse Laveran) [21, 22].

Depuis, plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodiums* différents ont été découvertes et il est admis que ces parasites peuvent infecter, outre l'homme, divers animaux endothermes comme les rongeurs, les singes, les oiseaux mais aussi ectothermes comme les lézards (sans oublier les moustiques, leurs vecteurs).

Quatre de ces espèces sont spécifiquement humaines: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*. Les premières descriptions des trois premières sont attribuables essentiellement à des scientifiques italiens (Battista Grassi, Angelo Celli, Amico Bignami, Camilo Golgi, Giusseppe Bastagnelli et ettore Marchiafava) entre 1880 et 1890 [23, 24] et John Stephens a le mérite d'avoir découvert la quatrième espèce, *Plasmodium ovale* en 1922 [25]. Une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi,* découverte par Robert Knowles et Das Gupta et connue pour infecter naturellement le singe

Macaca fascicularis [26], est aujourd'hui comptée parmi les espèces infectant l'humain [27]. La découverte des infections humaines par *P. knowlesi* a remis sur le devant le questionnement sur l'origine simienne du plasmodium, la transmissibilité inter-espèces des plasmodiums et donc sur l'existence d'un réservoir non-humain.

Les plasmodiums ont, outre leurs différences morphologiques, différents cycles de développement mais nécessitant pour tous le passage successif par deux hôtes : l'un vertébré et l'autre invertébré (moustique) tel qu'illustré dans la figure 4.

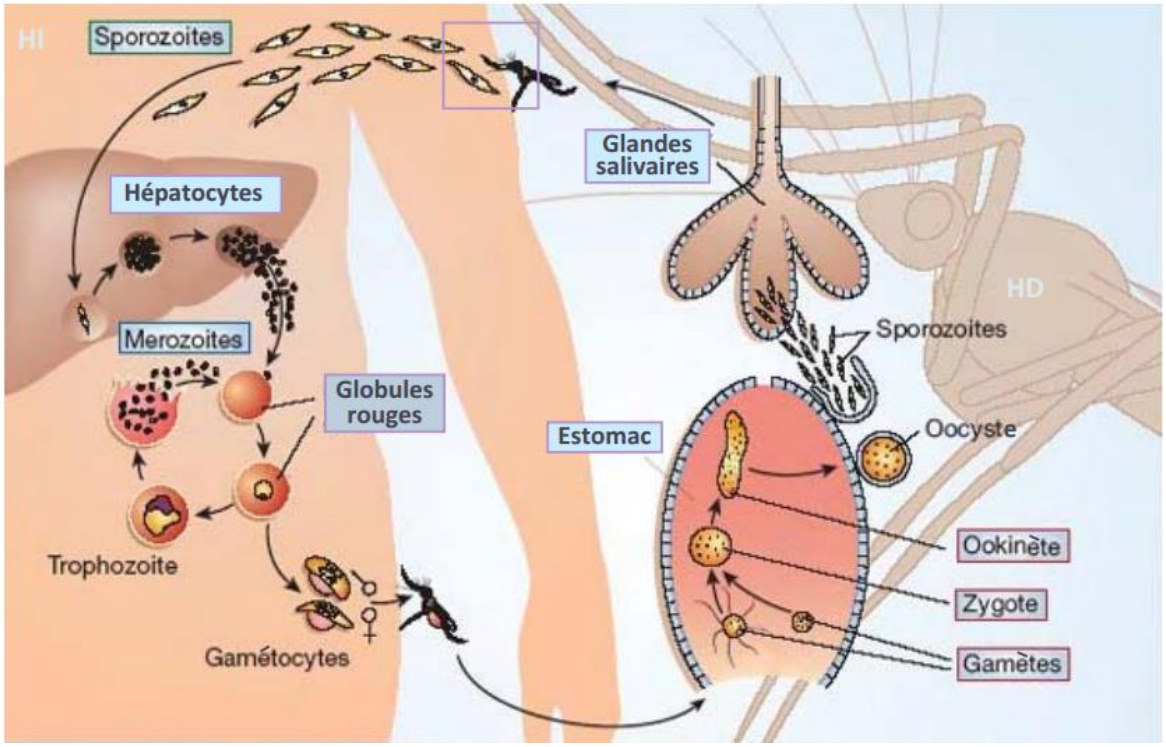


Figure 4. Cycle de vie du plasmodium chez l'homme et chez le moustique (de Ménard et al., Nature 2005 Jan 13; 433(7022):113-4)

Les plasmodiums humains sont inégalement répartis sur l'étendue de la planète, mais 2 espèces ont une prévalence supérieure par rapport aux autres. Il s'agit de *Plasmodium falciparum* qui est prépondérant en Afrique et en Asie et *P. vivax* qui l'est en Amérique latine. *Plasmodium falciparum* atteint dans certains endroits une prévalence supérieure à 80% (surtout dans la région africaine).

Plasmodium malariae et *Plasmodium ovale* sont généralement retrouvés à basse prévalence presque dans toutes les régions endémiques où leurs prévalences respectives ne dépassent que très rarement 10% [28]. Néanmoins, *Plasmodium malariae* requiert une attention particulière du fait qu'il peut induire un syndrome néphrotique qui résiste aux traitements conventionnels mais aussi qu'il est capable de provoquer des infections récurrentes, des décennies après l'infection initiale [29-32].

Plasmodium vivax par contre, bien qu'étant l'espèce plasmodiale dont la distribution géographique est la plus étendue [28], est presque absent de l'Afrique sub-saharienne. Cela a été attribué au fait que la pénétration des réticulocytes par *Plasmodium vivax* est dépendante de la présence d'une protéine appelée Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) ou Fy glycoprotéin (FY) [33-35]. Les populations africaines sont exclusivement ou très majoritairement de groupe sanguin Duffy-négatif (figure 5 & 6), ce qui leur confère une protection vis-à-vis de *P. vivax* [36]. Ce fait a d'ailleurs orienté la recherche (notamment vaccinale) vers des mécanismes pouvant bloquer la fixation du parasite sur cet antigène [37-40]. Par ailleurs des travaux assez récents ont démontré que l'existence seule de cet antigène n'était pas une condition suffisante à l'invasion réticulocytaire. Citons par exemple les travaux de Ryan et al. qui ont apporté une preuve de la possibilité d'infections à *P. vivax* chez des individus Duffy-négatifs au Kenya [41], de Ménard et al. qui ont rapporté la survenue fréquente d'infections à *Plasmodium vivax* à Madagascar toujours chez des sujets Duffy-négatifs [42], de Mendes et al. en Angola et en Guinée Equatoriale [43] ou encore de Wurtz et al. en Mauritanie [44]. Ces résultats ont bouleversé le vieux dogme d'une trentaine d'année de Miller et al. [34]. Deux hypothèses sont donc formulées à ce jour: soit il existe d'autres voies possibles d'invasion du globule rouge par le parasite, soit ce dernier a développé de nouveaux mécanismes d'invasion du globule rouge. Ce

qui ferait craindre son expansion à des régions où il était déclaré absent. Des recherches futures éclaireront ce point.

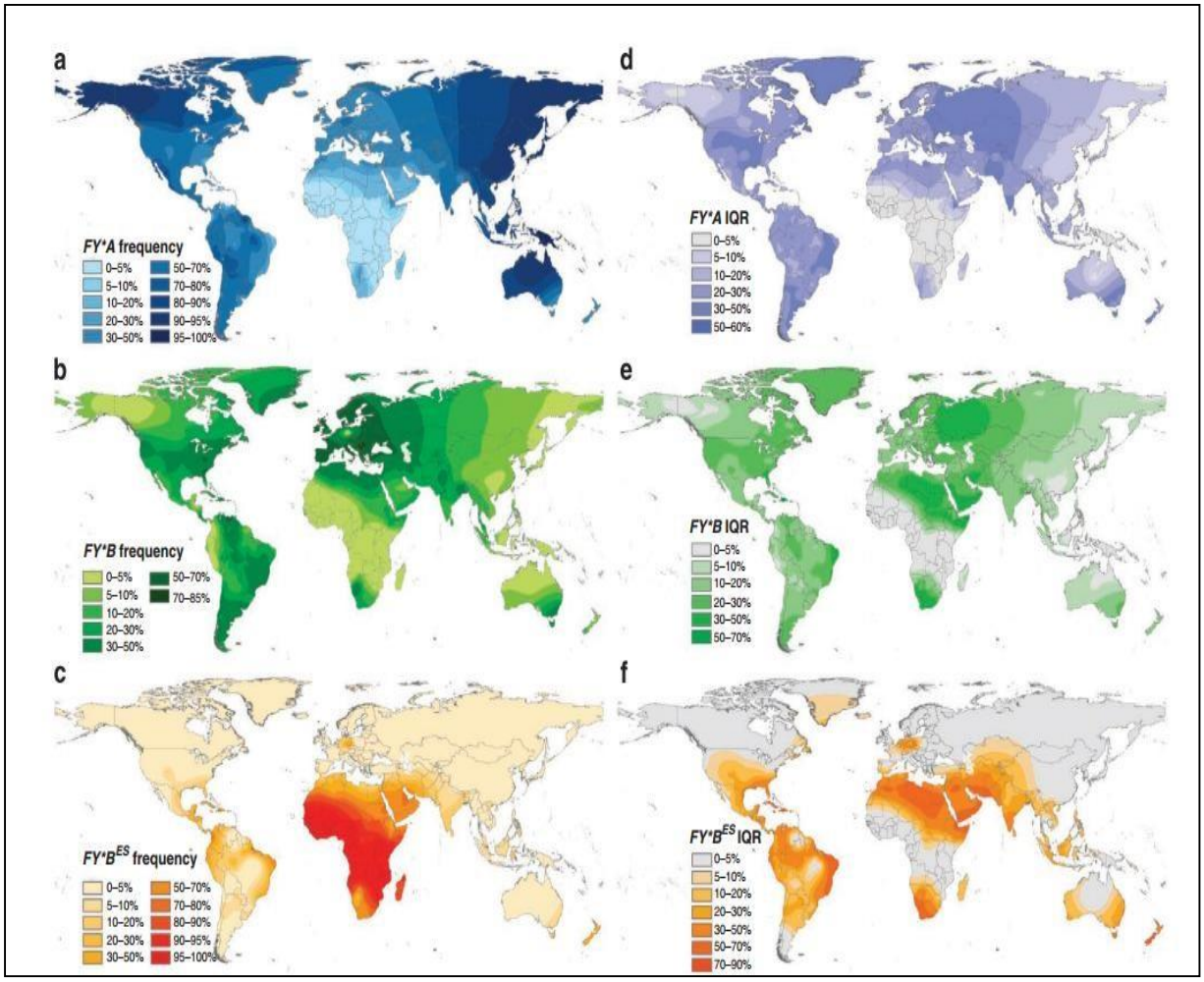


Figure 5. Fréquence et distribution des allèles du groupe sanguin Duffy (de Rowes E et al.,Nature Communications 2011, 266)

La classification des plasmodiums a été sujette à plusieurs modifications au fil des années et des découvertes. Les espèces du genre *Plasmodium* sont généralement regroupées en 9 sous-genres dont 3 sous-genres parasites des mammifères, 4 sous-genres parasites des oiseaux et 2 sous-genres parasites des sauriens.

Les plasmodiums des mammifères sont depuis toujours les plus étudiés et ils ont été subdivisés initialement en *Plasmodium, Vinckeia et Laverania*. L'avènement des méthodes moléculairaires a permis à Duval et Ariey [45] de de simplifier cette classification en deux groupes principaux: Laverania et non-Laverania. *P. falciparum* est à ce jour la seule espèce du groupe Laverania ayant la capacité d'infecter naturellement l'humain.

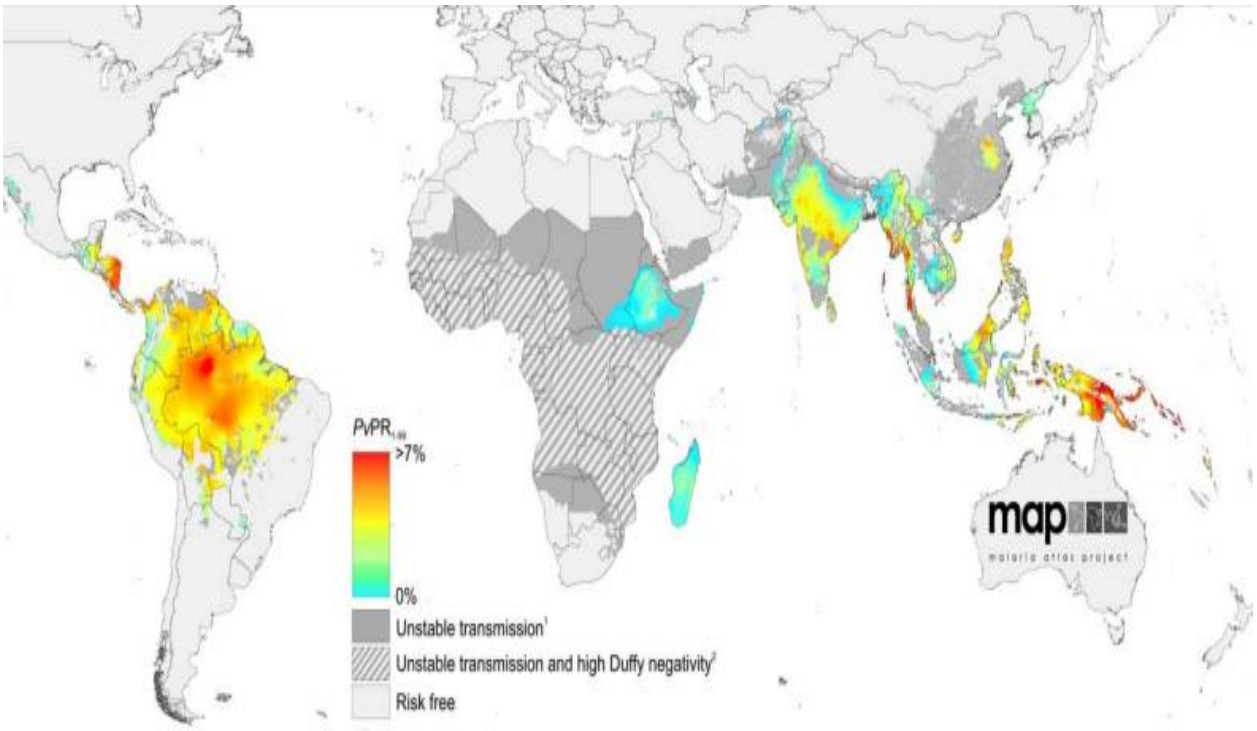


Figure 6. Distribution spatiale de *P. vivax* en 2010 (De Gething P et al., PLoS Negl Trop Dis 6(9)e1814)

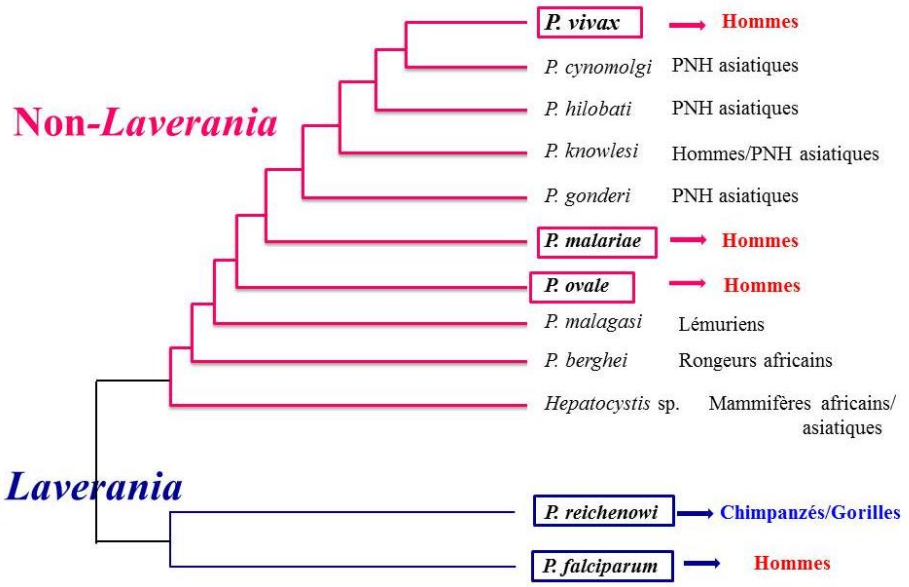


Figure 7. Phylogénie schématique des plasmodiums des mammifères (De Duval et Ariey, Clin Microbiol Infect 2012 ;18 :528-32)

I.3. Approche diagnostique

Pendant des décennies, le diagnostic du paludisme a reposé sur l'observation clinique et l'identification microscopique des parasites. L'expression clinique du paludisme est très variable selon que l'on est en présence d'un accès simple ou un cas de paludisme grave. Mais généralement le point central est la « fièvre » s'accompagnant (ou pas) d'autres symptômes tels que maux de tête, douleurs musculaires, asthenie, toux, vomissements, diarrhée, etc pour les cas simples et d'une atteinte des fonctions essentielles de l'organisme mettant en péril le pronostic vital dans les accès graves.

En zone d'endémie donc, le paludisme étant responsable d'une grande proportion des états fébriles, il a même été jugé acceptable, à une certaine époque, de considérer et de traiter les cas de fièvre comme étant des accès palustres. Cette manière de faire s'est même retrouvée dans les recommandations formulées par

l'OMS en 2006, qui reconnaissait que le diagnostic parasitologique n'était pas tout le temps nécessaire, particulièrement en zone de forte transmission [46].

Malheureusement, cette approche est rendue difficile du fait que la fièvre n'est pas le seul signe clinique du paludisme et aussi du fait de l'absence de spécificité des autres signes cliniques, qui se confondent à bien d'autres pathologies tropicales. Ce chevauchement de symptomatologie entre paludisme et autres pathologies altère la spécificité du diagnostic, favorise une utilisation à l'aveugle des antipaludiques et compromet la qualité des soins pour les patients faisant une fièvre non palustre.

Un algorithme décisionnel fondé sur la clinique a été mis en place par l'OMS et l'UNICEF, et a été largement utilisé, afin de parer à certaines faiblesses humaines et matérielles des pays à faibles revenus, appelé « prise en charge intégrée des maladies de l'enfant » (PCIME). Perkins et al. , tout comme Weber et al. ont dans leurs travaux respectifs, démontré les lacunes de l'utilisation d'un diagnostic uniquement fondé sur la clinique [47,48]. Tarimo et al. ont par contre chiffré à 30% la prévalence d'enfants surtraités (traités comme faisant un paludisme alors que soufrant d'autre chose) en utilisant l'algorithme clinique de la PCIME pour le diagnostic du paludisme [49]. De même, Reyburn et al. dans leur étude réalisée en Tanzanie rapportent que seulement 46.1% des cas fébriles traités comme faisant un paludisme, étaient réellement porteurs de *Plasmodium falciparum* [50]. Ces écarts ont poussé l'OMS à formuler de nouvelles recommandations en 2010 stipulant qu'en toute région du globe, une suspicion clinique de paludisme doit être confirmée par un diagnostic parasitologique [51- 52].

Les moyens diagnostiques du paludisme mis au point à ce jour sont nombreux. Nous en faisons un rappel succinct ci-dessous mais en consacrant une attention particulière au diagnostic moléculaire par amplification génique.

I.3.1. Examen microscopique après coloration

La coloration de Giemsa a été pendant longtemps le "gold standard" du diagnostic palustre. Il s'agit de déposer une goutte de sang sur une lame et de la colorer afin de rendre identifiable les parasites, au milieu des autres éléments figurés du sang (Figure 8).

La goutte épaisse et le frottis mince permettent d'identifier le parasite, d'en déterminer l'espèce mais aussi d'en estimer la parasitémie. La réalisation de ce test ne requiert pas de matériel compliqué mais plutôt une formation adéquate pour la coloration et la lecture des lames (particulièrement pour identifier les espèces en cas de faible parasitémie ou d'infections mixtes) et un temps conséquent pour obtenir les résultats.

Un microscopiste moyen peut détecter environ 50-100 parasites/µl alors qu'il est estimé qu'un microscopiste expérimenté peut détecter jusqu'à 5 parasites/µl [53].

I.3.2. Quantitative Buffy Coat (QBC) test

Méthode proposée par la firme Becton-Dickinson et fondée sur une centrifugation différentielle et le fait que l'acridine orange (un fluorochrome) a la propriété de colorer les cellules contenant du matériel nucléique. En résumé, 50µl de sang sont recueillis dans un tube à hématocrite contenant de l'acridine orange et un anticoagulant, qui est soumis à une centrifugation (à 12.000g pendant 5 minutes). L'acridine orange, après excitation par une source lumineuse appropriée induit chez les parasites qui contiennent de l'ADN une coloration métachromatique différentielle entre l'ADN (vert pomme à jaune vert) et l'ARN (vert à rouge orangé) [54]. Elle révèle la présence des parasites sur le fond sombre des hématies dépourvues de structures nucléiques systématisées.

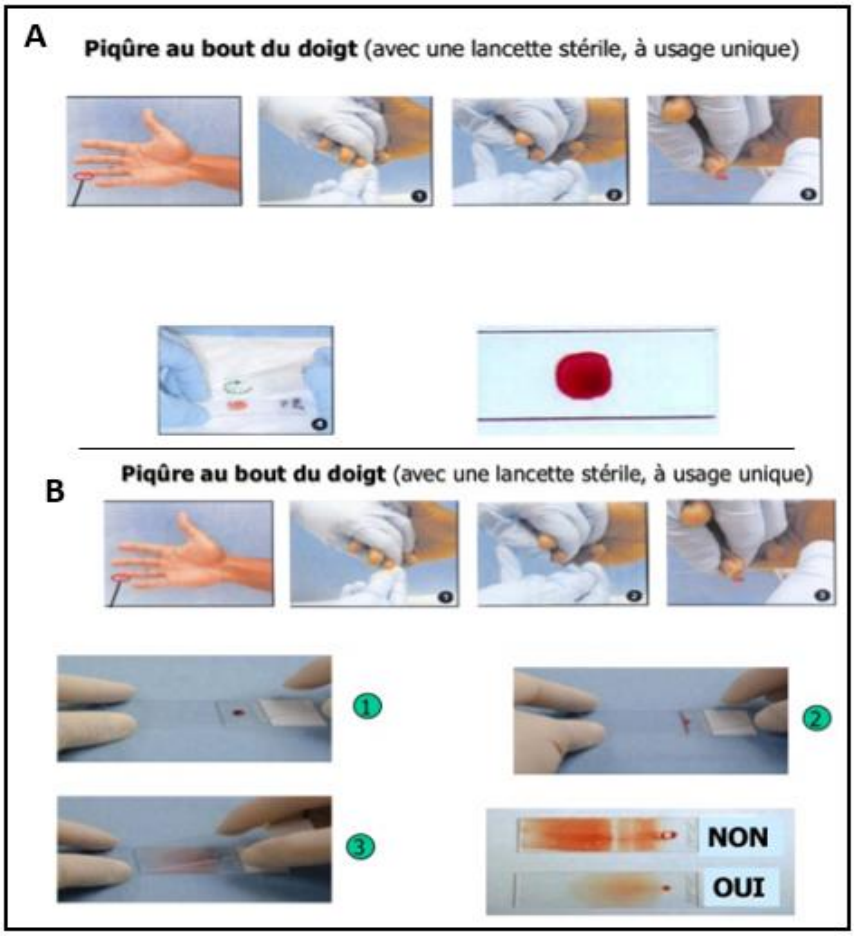


Figure 8. Préparation de la goutte épaisse (A) et du frottis mince (B)

D'apprentissage facile et de réalisation rapide, le QBC test nécessite un matériel et des réactifs coûteux ayant limité son utilisation. De même, il ne permet pas de différencier les espèces plasmodiales ni de renseigner sur la densité parasitaire [55]. Baird et al. qui ont comparé la microscopie au QBC test sur le terrain ont démontré que ce dernier était plus contraignant et moins sensible [56].

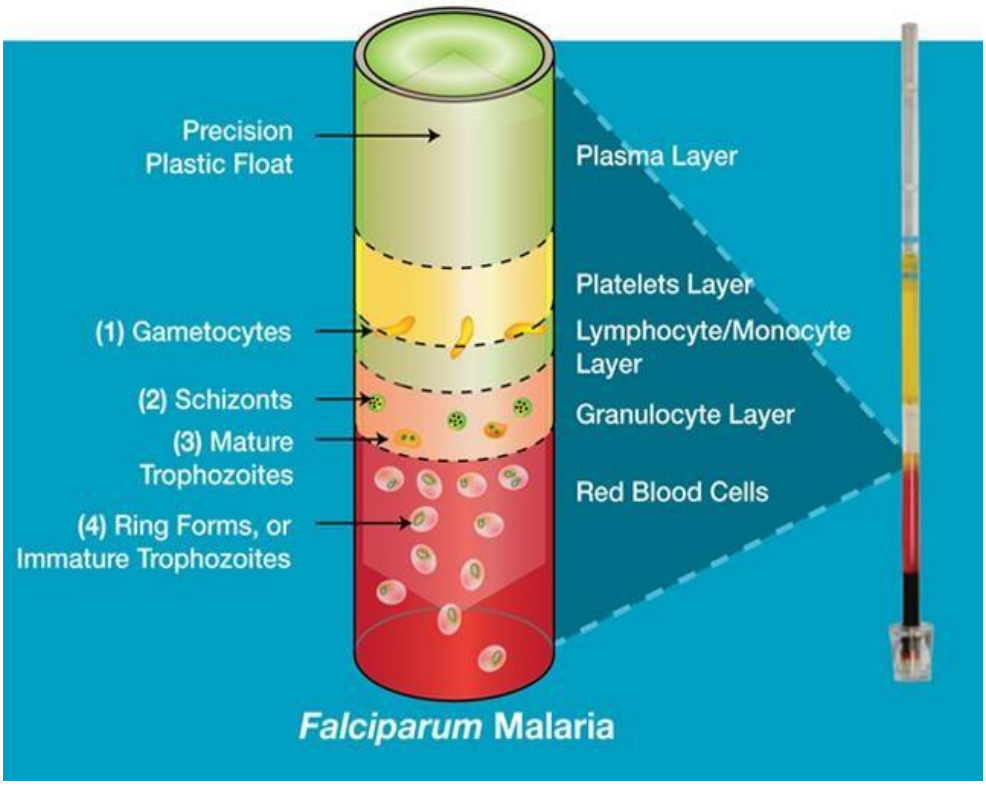


Figure 9. QBC malaria tube (de chez Woodley laboratory diagnostics http://www.woodleyequipment.com/)

I.3.3. Sérologie

Ces méthodes diagnostiques sont généralement fondées sur la détection des anticorps dirigés contre les formes sanguines asexuées du *Plasmodium*. Elles ont été largement utilisées pour la prévention du paludisme transmis par transfusion par les banques de sang [57, 58]. Différentes réactions sont utilisées, telle que l'immunofluorescence indirecte (IFI), l'hémagglutination passive et les tests immuno-enzymatiques du type ELISA [59-61]. Ces techniques ne renseignent en fait que d'un contact passé ou récent de l'organisme avec le parasite.

Elles n'ont que très peu de valeur en zones d'endémie car il y existe de très nombreux porteurs asymptomatiques, jouissant d'une immunité protectrice suite à un contact prolongé avec le parasite.

I.3.4. Cytométrie en flux continu

Nécessitant un appareillage très sophistiqué et donc très coûteux [62], cette technique n'a pas connu une large diffusion dans les régions endémiques palustres, correspondant généralement aux pays à faibles revenus. Elle permet néanmoins de détecter les globules rouges parasités après que l'ADN parasitaire ait été marqué par du thiazol orange [63] ou par d'autres colorants. D'une grande sensibilité pour déterminer la densité parasitaire, elle ne permet cependant pas de distinguer les différentes espèces plasmodiales.

I.3.5. Les tests de diagnostic rapides (TDR)

Les TDR sont fondés sur la détection de protéines spécifiques de *Plasmodiums* dans le sang des personnes infectées à l'aide d'une membrane en nitrocellulose contenant des anticorps anti-plasmodiums. Ils ne nécessitent ni source électrique, ni équipement de laboratoire particulier et permettent de diagnostiquer assez rapidement une infection plasmodiale. De plus ils se conservent jusqu'à 30°C pour la plupart. Ils ciblent généralement les antigènes parasitaires suivants : l'histidine-rich protein 2 (HRP-2), la lactate déshydrogénase (LDH) et/ou l'aldolase selon le test et les combinaisons choisies. Plusieurs tests ont été développés avec des particularités et sensibilités différentes. Certains permettent de détecter spécifiquement soit *P. falciparum* [64], soit *P. vivax* [65] ou encore *P. knowlesi* [66]. D'autres par contre permettent de différencier une infection soit à *P. falciparum seul,* soit à l'une des 3 autres espèces plasmodiales (*P. vivax, P. malariae* and *P. ovale),* labellé comme « pan » sur le dispositif. Les TDR « pan » permettent de reconnaître les 4 espèces humaines mais avec une sensibilité moindre pour les espèces non-falciparum. Les figures 9 et 10 illustrent leur fonctionnement de manière globale ainsi que l'interprétation des résultats possibles.

Il a été cependant mis en lumière la possibilité d'obtenir des faux négatifs en cas d'utilisation de tests basés sur la détection du HRP-2, certaines souches de *P. falciparum* n'exprimant pas ce gène [67].

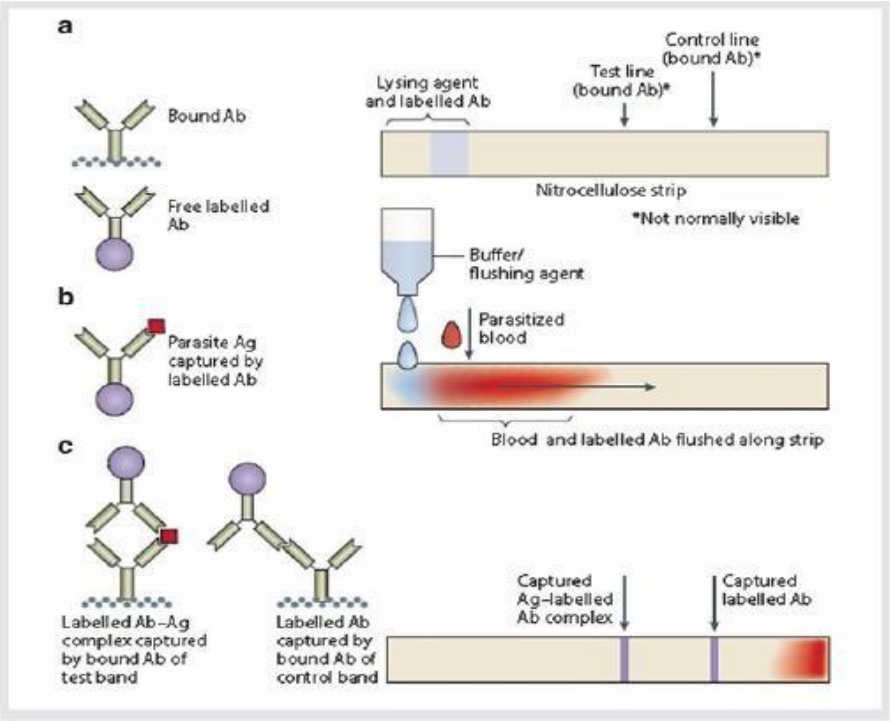


Figure 10. Composition et mécanisme de détection des tests immunochromatographiques pour le paludisme (de Bell D et al., Nature Reviews Microbiology 2006 : **4** ; 682-695)

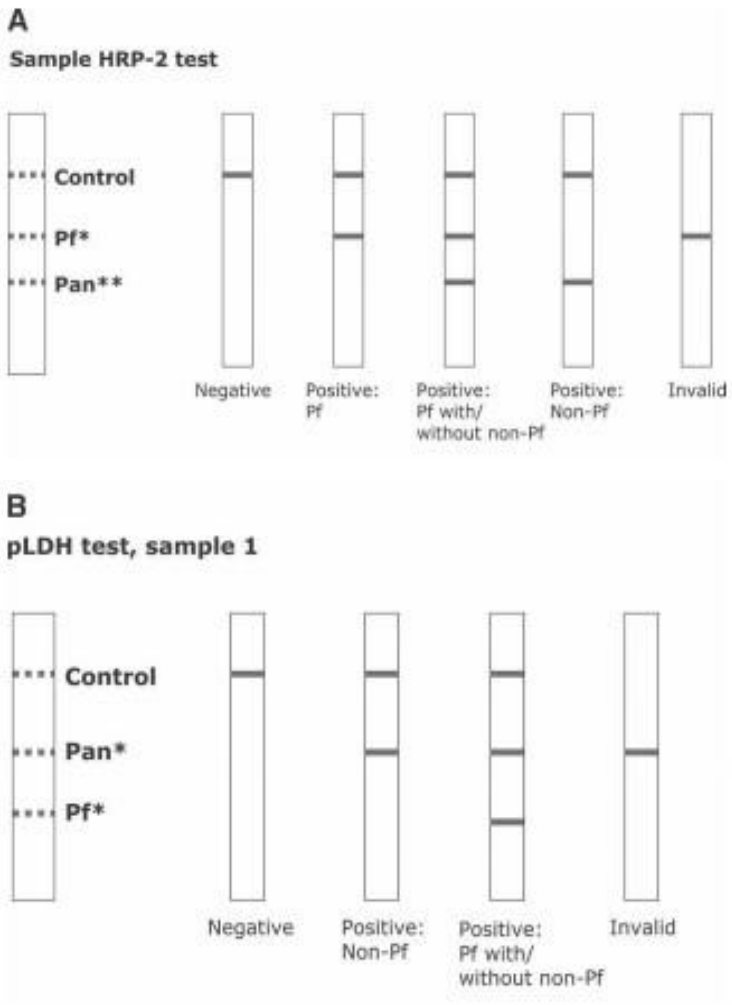


Figure 11. Configuration et interprétation des résultats de 2 types de TDR commerciaux A.Test fondé sur détection de HRP-2. B. Test fondé sur détection de pLDH

I.3.6. Diagnostic moléculaire

L'essor de la biologie moléculaire a permis de développer de nouvelles techniques fondées sur l'identification de l'ADN plasmodial amplifié par polymerase chain reaction (PCR). Grâce à des courtes séquences nucléotidiques qui s'apparient au génome du *Plasmodium* de part et d'autre de la portion d'intérêt

(amorces) et surtout à l'utilisation d'une enzyme thermostable, la Taq polymerase [68], l'ADN est multiplié de manière exponentielle jusqu'à devenir

détectable soit par sa visualisation sous lumière UV (dans la PCR classique), soit par détection d'une fluorescence à chaque duplication par des sondes fluorescentes [69, 70] ou par technologie SYBR Green (dans la PCR en temps réel). Cette approche moléculaire permet de détecter de très faibles concentrations parasitaires et de distinguer les différentes espèces infectantes même si elles sont présentes simultanément chez le même individu (infections mixtes).

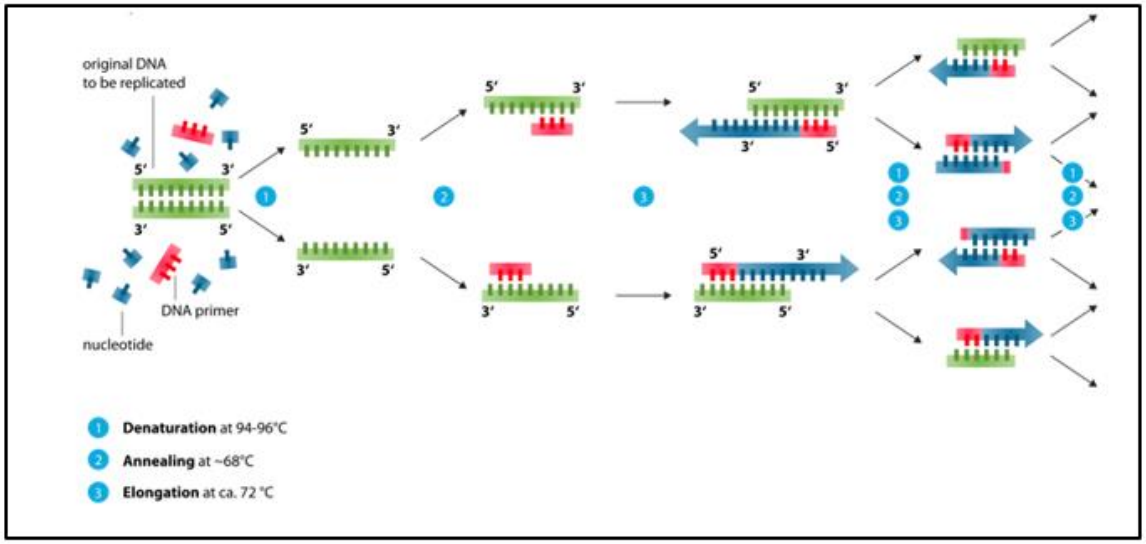


Figure 12. Différentes étapes du processus de la PCR (de https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

Les premières descriptions de techniques moléculaires de détection de *P. falciparum* dans la littérature remontent aux années 90s avec les travaux de Barker et al. [71, 72], de Wataya Y et al. [73] et de Sethabutr O et al [74]. Une des techniques qui a connu un grand succès est celle mise au point par Snounou et al. qui, contrairement aux précédentes qui ne détectaient qu'une seule espèce plasmodiale (*P. falciparum*), permettait la détection des 4 espèces de *Plasmodiums* humains par PCR classique, grâce à des amorces spécifiques à

chacune des espèces [75]. La sensibilité de cette technique a été améliorée quelques temps plus tard par ses concepteurs en ajoutant une seconde PCR à la première [76]. Cette technique est appelée PCR nichée (voir Figure 14). Cette dernière technique a connu un large succès dans la communauté scientifique et est toujours considérée à ce jour comme référence, citée par 568 publications à ce jour [77].

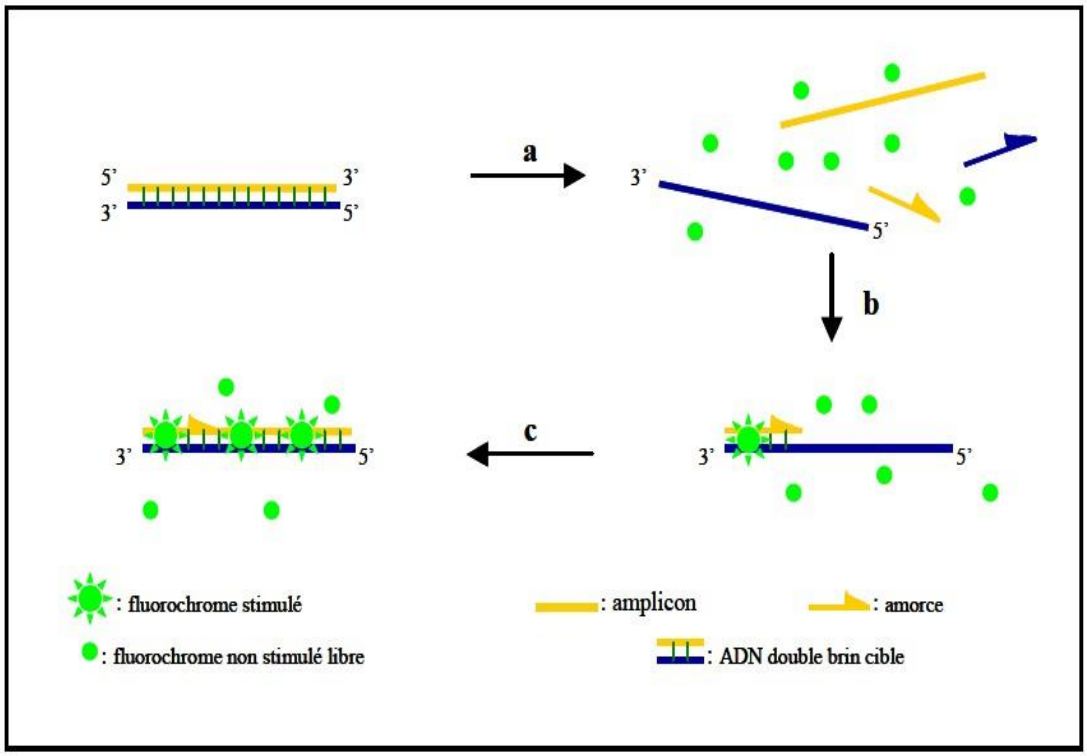


Figure 13. Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay).

(a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (**b**) À la température

(b) d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (**c**) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. (de Poitras E et Houde A, Reviews in Biology and Biotechnology 2002: 2; 2-11)

De nombreuses autres techniques, utilisant différentes amorces et sondes (pour la PCR en temps réel), ont été développées ou modifiées en vue d'accroitre la sensibilité et la spécificité mais aussi de réduire le temps de réalisation. C'est

ainsi qu'à titre d'exemple nous pouvons citer la technique mise au point par Rougemont et al. [78] et améliorée par Cnops et al. pouvant atteindre des seuils de détection de l'ordre de 0,006 parasites/µl [79], ou encore celle mise au point par Tran et al, combinant PCR classique et PCR en temps réel (nested qPCR) pour arriver à un seuil de 0,5 parasite/µl, pour des prélèvements effectués sur papiersfiltres [80]. Kamau et al. ont atteint une limite de détection de 3,62 10^{-4} parasites/µl en utilisant une reverse transcriptase real-time PCR [81].

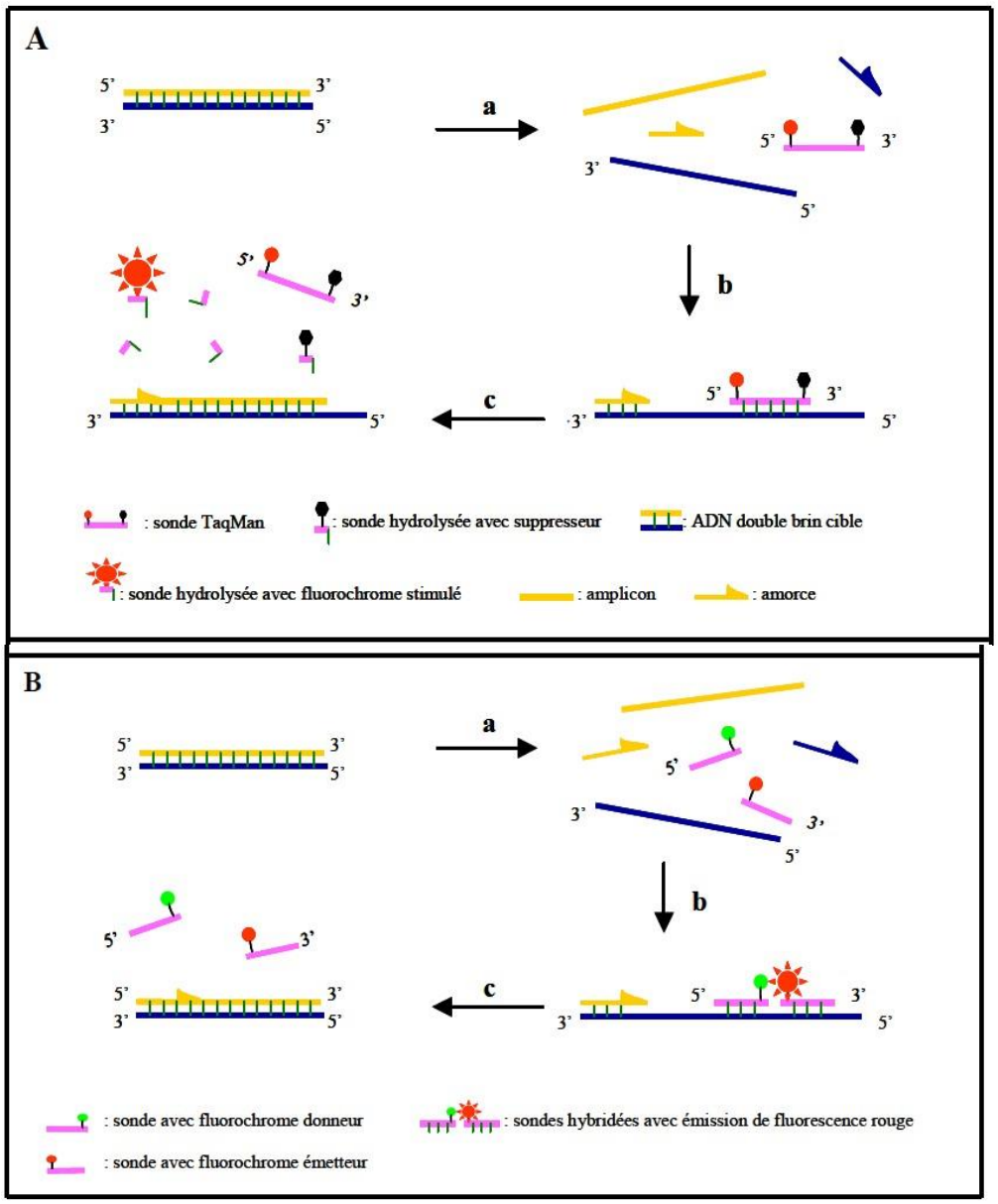


Figure 14. A: Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.

(b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (**c**) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

B: ***Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)***

(a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution.

(b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (**c**) Les sondes retournent libres en solution.

(de Poitras E et Houde A, Reviews in Biology and Biotechnology 2002: 2; 2-11)

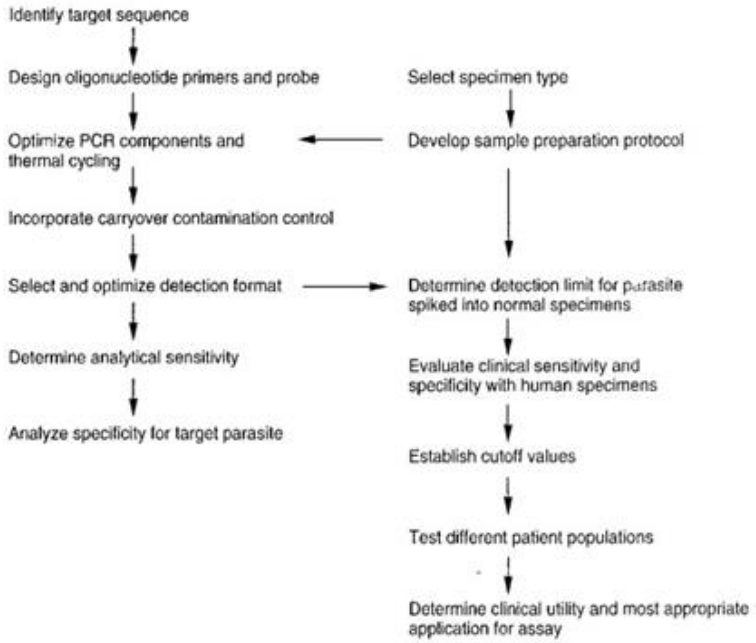


Figure 15. Représentation schématique de la démarche pour le développement d'une PCR diagnostique

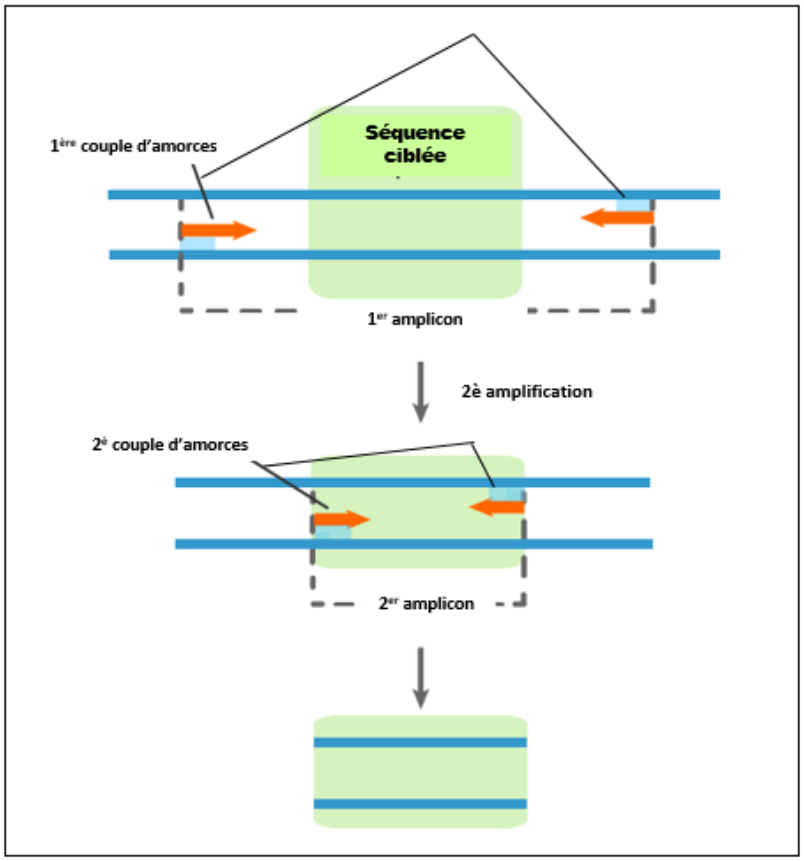


Figure 16. Représentation schématique d'une PCR nichée

La plupart de ces techniques de PCR ont été élaborées en ciblant le gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomial (18S rRNA). En effet ce gène que l'on retrouve chez tous les eucaryotes, contient des régions à la fois hautement conservées et variables, et il a été le plus étudié chez le *Plasmodium*. Cinq copies de ce gène sont dispersées sur des chromosomes différents du génome parasitaire [82,83]. Néanmoins d'autres gènes ont aussi été utilisés, mais moins fréquemment, comme cibles pour l'identification moléculaire des *Plasmodiums*. Nous pouvons citer à titre d'exemple le gène cytochrome b (*cytb*), qui lui aussi possède une région hautement conservée [84-87], le gène codant pour la protéine circumsporozoïte (*csp*), qui a été utilisée pour identifier *P. falciparum* et *P. vivax* [878, le dihydrofolate reductase (*dhfr*) [72], le ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) [89], le merozoite surface protein-1 (*msp-1*) [90], la cycloxygénase mitochondriale (cox1) [91] et le reticulocyte binding protein 2

(*rbp2*) [92]. Ces techniques sont conçues en monoplex (amplifiant une cible unique) ou en multiplex (amplifiant une ou plusieurs cibles).

A titre d'illustration, Chew et al. ont mis au point une PCR hexaplex capable d'identifier simultanément six espèces plasmodiales infectant l'humain [93]. La précision de ces techniques a permis de discriminer les différentes espèces lors des infections mixtes mais aussi de différencier les deux sous-espèces de *P. ovale* (*P. ovale walikeri* et *P. ovale curtisi*), longtemps méconnues [92, 94].

Beaucoup de facteurs peuvent expliquer les différences de sensibilités de ces différentes techniques, entre autres: le type de réactifs employés, les standards utilisés pour la quantification, les dilutions effectuées, les types de thermocycleurs, les méthodes d'analyses et d'interprétation des données, etc.… [95]. En regard à ces divergences, Bustin et al. ont proposé des lignes directrices pour la publication des expériences de PCR quantitative en temps réel (MIQE guidelines), en vue d'aider à assurer l'intégrité de la littérature scientifique, de promouvoir la cohérence entre les laboratoires, et d'accroître la transparence expérimentale [96].

Outre l'identification moléculaire des *Plasmodiums* réalisée généralement sur du matériel sanguin soit liquide, soit séché sur papier-filtre, soit déposé et coloré sur lame [97], ou encore provenant des TDR

[98], l'utilisation d'autres fluides organiques est néanmoins décrite dans la littérature. Mharakurwa et al. [99], de même que Nwakanma et al. [100] ont rapporté dans leurs travaux respectifs des preuves de détection possible par PCR de *Plasmodium* dans la salive et l'urine. Par contre, Liu et al. ont pu détecter *P. falciparum* dans les fèces de grands primates africains [101].

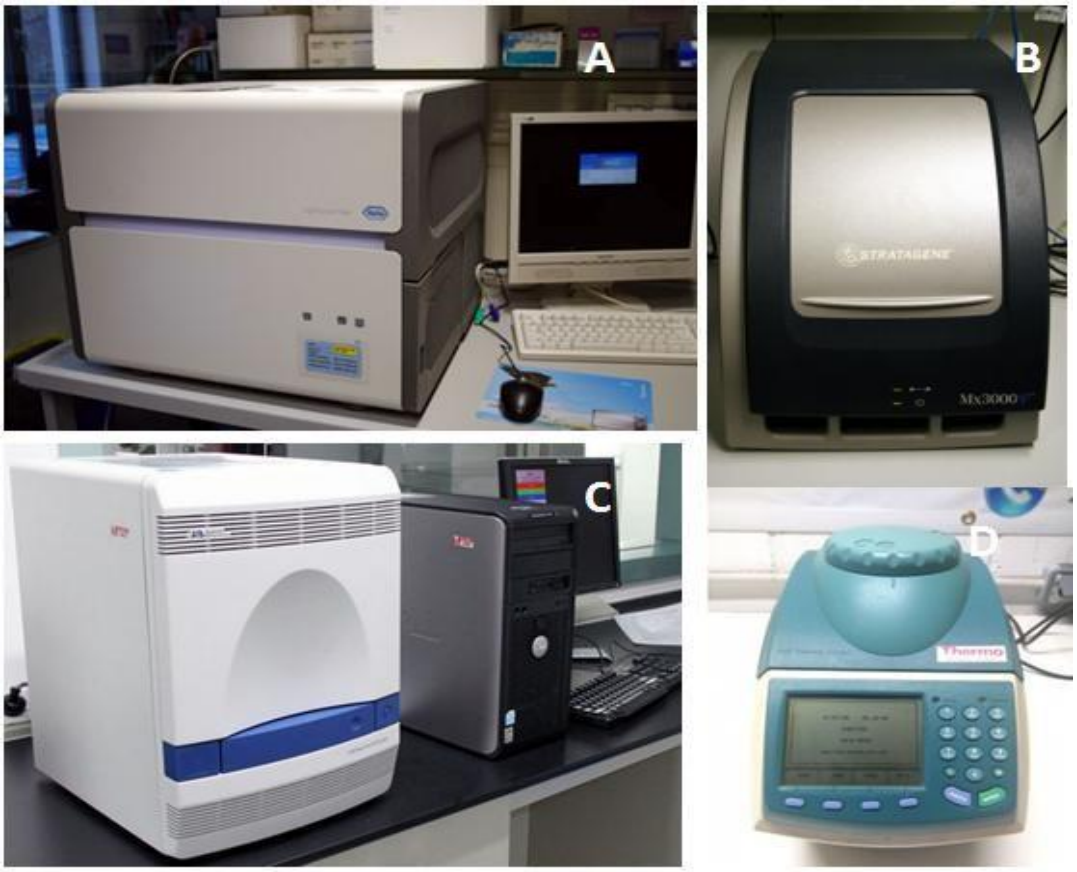


Figure 17. Différents types de thermocycleurs **A.** Lightcycler 480 (Roche®) **B.** Stratagene Mx3000P (Agilent Genomics®) **C.** ABI 7500 (Applied Biosystems®) **D.** Hybaid PXE (Thermo®)

I.4. Des molécules antipaludiques

A ce jour, de nombreuses molécules ont été synthétisées et mises sur le marché pour lutter contre le paludisme. Différentes manières existent pour classifier ces différentes molécules en se basant soit sur leurs structures chimiques, leurs classes pharmaceutiques, leurs actions sur les diverses formes évolutives du parasite ou encore sur leurs cibles d'action. Nous préférons décrire cette dernière classification, car en rapport avec les mécanismes de résistance possibles.

Trois cibles plasmodiales principales des antipaludiques peuvent être énumérées :

- La vacuole digestive du parasite : siège de la digestion de l'hémoglobine et de la cristallisation de l'hème ;
- Le cytoplasme avec deux organites essentiels : le système mitochondrial, siège des processus enzymatiques et l'apicoplaste, siège de nombreux processus cellulaires et voies de synthèse telles que la réplication de l'ADN, la transcription et la translocation ;
- La membrane constituée de phospholipides et de canaux calciques.

En regard à ces différentes cibles, deux grands groupes d'antipaludiques peuvent être élaborés: les schizonticides électifs et les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétabolites.

I.4.1. Les schizonticides

Ce groupe comprend premièrement les dérivés quinoléiques regroupant :

- les amino-4-quinoléines, représentés par la chloroquine et l'amodiaquine ;
- les amino-8-quinoléines représentés pas la primaquine, la rhodoquine et la plasmoquine ;
- les amino-alcools représentés par la luméfantrine, la quinine, la méfloquine et l'halofantrine .

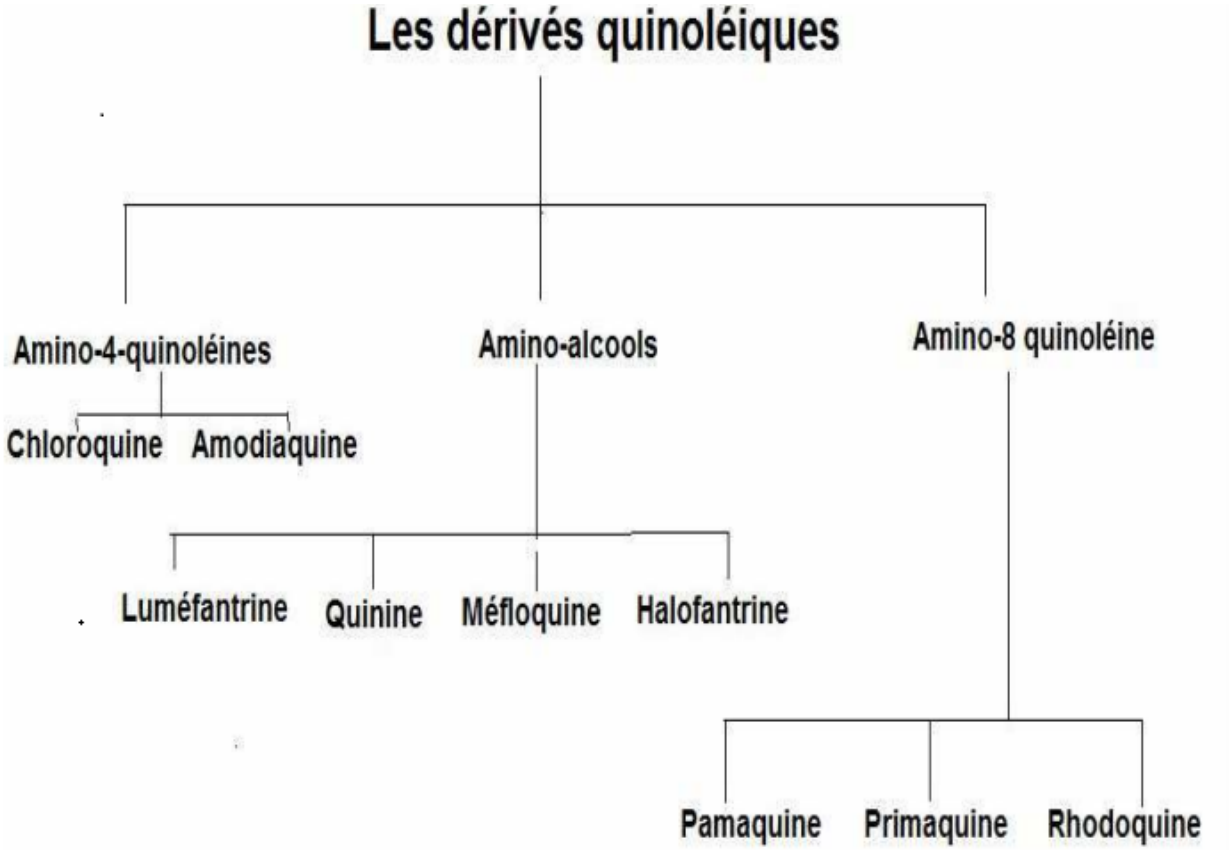


Figure 18. Classification des molécules antipaludiques dérivés quinoléiques

Il comprend également les dérivés (semi-synthétiques) de l'artémisinine représentés par l'artésunate, la dihydroartémisinine, l'artéméther et l'artéether.

Les dérivés quinoléiques interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive parasitaire en inhibant la formation de l'hémozoïne tandis que pour les dérivés de l'artémisinine, quoi que le mécanisme de leur action ne soit complètement élucidé, il a été suggéré que le pont endopéroxyde de la molécule faciliterait la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite [102] ou encore que inhiberait la digestion de l'hémoglobine et de la cristallisation de l'hème dans la vacuole digestive parasitaire [103].

I.4.2. Les inhibiteurs des acides nucléiques

Ces molécules sont connues pour bloquer la division du noyau parasitaire. Dans ce groupe l'on répertorie :

- les antifolates, représentés par les antifoliques (sulfadoxine) et les antifoliniques (proguanil et pyriméthamine). Cette classe agit indirectement au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques en inhibant deux enzymes clairement identifiées : la dihydroptéroate synthéthase (DHPS) pour la synthèse de l'acide folique et la dihydrofolate réductase (DHFR) pour la synthèse de l'acide folinique [104]
- les naphtoquinones, représentés par l'atovaquone, un inhibiteur des fonctions mitochondriales en agissant au niveau de la dihydroororate déshydrogénase (DHOdase). L'inhibition de cette enzyme empêche bloque toute une cascade de réactions entrainant l'inhibition de la synthèse des bases pyrimidiques [105].
- les antibiotiques, représentés certaines classes : les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine et la clindamycine) et les quinolones (ciprofloxacine). Ces antibiotiques ont démontré une action antiplasmodiale in vivo et in vitro. Ils agissent sur la synthèse des protéines de l'apicoplaste en agissant sur les ribosomes [106].

I.4.3. Des nouvelles molécules en développement

En cette époque où *P. falciparum* a développé des mécanismes de résistance à la majorité des antipaludiques disponibles, il est clair que nous allons devoir nous tourner vers de nouvelles molécules ayant des cibles moléculaires différentes des antipaludiques actuels. Nous présentons ici quelques unes d'entres elles avec une activité clinique prouvée.

I.4.3.1. Les ozonides

Deux molécules synthétiques ont déjà fait leurs preuves dans le traitement clinique et sont actuellement en phases d'essai: ce sont l'arterolane (OZ 277) et l'artefenomel (OZ 439). L'artérolane est rapidement actif sur *P. falciparum* et *P. vivax* et est en ce moment utilisée en Inde (Phase 4) associé à la pipérquine phosphate [107]. L'artefenomel qui est éliminé plus lentement que l'arterolane (46-62h vs 2-4h) est en Phase 2 [108].

I.4.3.2. La ferroquine

Elle est active sur les souches de *P. falciparum* chloroquino-résistanteset a été bien tolérée en combinaison avec l'artésunate lors des études cliniques de Phase 2. La ferroquine est éliminée de l'organisme en 16 jours [109].

I.4.3.3. La cipargamine (KAE 609)

C'est une spiroindolone actuellement en Phase 2 de développement. Elle a un temps de clairance parasitaire très élevée de moins d'une heure! Elle est active sur les souches résistantes aux antipaludiques actuels [110].

I.4.3.4. KAF 156

Cette molécule active sur les stades sanguins et hépatiques de *P. falciparum* représente une nouvelle classe d'antipaludiques actuellement en Phase 2. Avec un temps de clairance parasitaire de 3,5 heures tant pour *P. falciparum* que *P. vivax*, elle présente de bons espoirs [111].

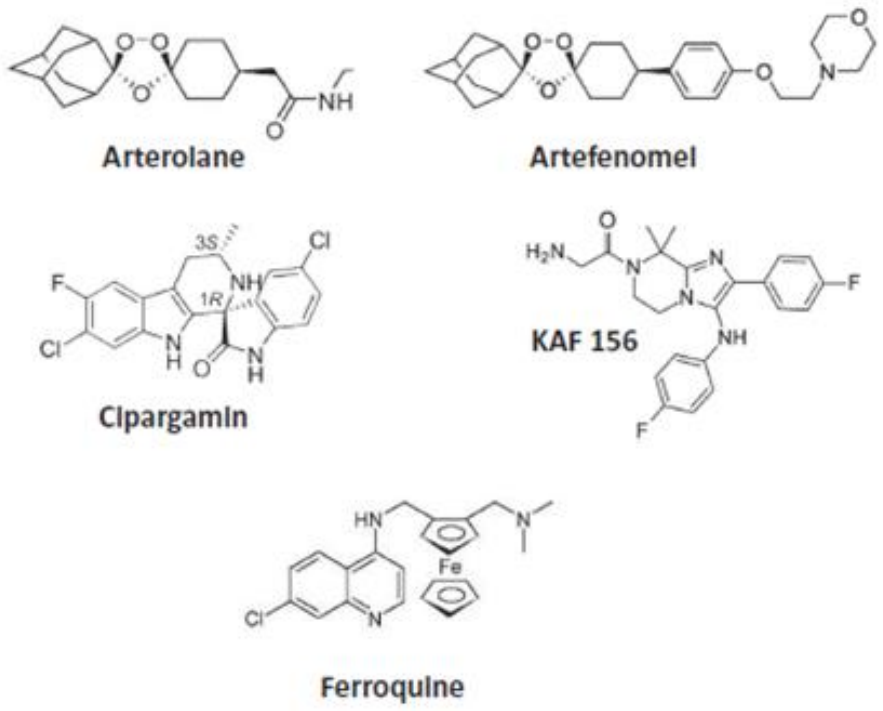


Figure 19: Structure chimique de quelques nouvelles molécules antipaludiques

I.5. De la résistance aux antipaludiques

Si *P. falciparum*, parasite responsable de la quasi-majorité des cas graves de paludisme, a su s'adapter et développer des mécanismes de résistance vis-à-vis de presque tous les antipaludiques disponibles, ceci est dû à sa grande diversité génétique, à un taux élevé de mutations dans son génome [84] et aussi au nombre important de parasites en circulation, hébergés chez les individus infectés. La chimiorésistance a toujours constitué un problème majeur pour le contrôle et l'élimination du paludisme.

De nombreuses études ont été menées afin d'identifier et de comprendre les différents mécanismes de résistance de ces parasites vis-à-vis des différentes molécules antipaludiques. La majorité des travaux existants concernent *P. falciparum;* très peu d'études ont été réalisées pour *P. vivax* et encore beaucoup moins en ce qui concerne *P. malariae, P. ovale ou P. knowlesi.* Ceci est bien

illustré dans une étude répertoriant 435 études sur l'efficacité thérapeutique in vivo des drogues antipaludiques : quatre-vingt-sept pour cent (87%) de ces études concernaient *P. falciparum*, 11% seulement *P. vivax* et moins d'une dizaine en rapport avec *P. malariae* [112].

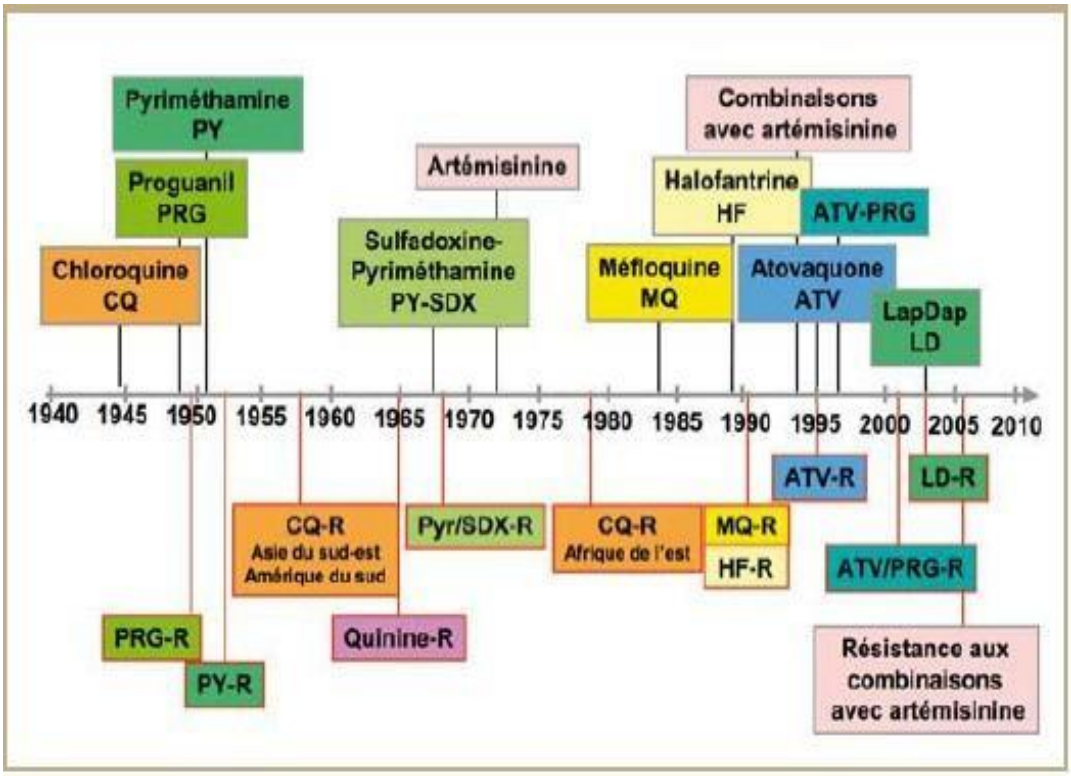


Figure 20. Chronologie de l'apparition des résistances aux antipaludiques. Date de première mise sur le marché et date d'apparition du premier cas de résistance indiqués respectivement au-dessus et en dessous de la ligne du temps (de Pradines B et al. Revue francophone de laboratoires 2010; 422:51-62)

La résistance de *P. falciparum* pose un grand problème dans la lutte contre le paludisme du fait de son incidence sur la morbi-mortalité. En effet, les patients traités avec ces molécules pour lesquelles le parasite a développé des mécanismes de résistance, ne voient pas leurs masses parasitaires diminuer critiquement ni leurs symptômes disparaître comme il se devrait dans des conditions normales. Il s'est rapidement avéré essentiel d'étudier cette chimiorésistance en profondeur afin d'élaborer des stratégies de riposte. Une des stratégies adoptée par l'OMS est de changer de molécule antipaludique lorsque

la prévalence des souches résistantes dépasse un certain seuil. Cela suppose donc une surveillance continue.

Des experts de l'OMS ont donc élaboré un guide pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques reprenant trois méthodes: les tests in vivo, les tests in vitro et l'usage des marqueurs moléculaires. Cette dernière méthode a été rendue possible grâce aux nombreux travaux réalisés le siècle dernier sur le génome de

P. falciparum. Rappelons ici que le génome complet de *P. falciparum* a été publié en 2002 par un consortium comprenant divers chercheurs qui s'étaient le répartis le travail en trois groupes: le Centre Sanger pour l'étude des chromosomes 1, 3-9 et 13), l'Université Stanford pour le chromosome 12 et l'Institut pour la recherche de Genomique et le programme malaria du Centre Naval de Recherches Médicales des USA pour les chromosomes 2, 10, 11 et 14. Il ressort des conclusions de ce travail que le génome de *P. falciparum* est constitué de 14 chromosomes, regroupant un total de 22,8 Megabases et 5314 gènes protéiques estimés [84].

Mais l'usage des marqueurs moléculaires n'est possible que quand ces derniers ont été validés, c'est-à-dire lorsque la preuve scientifique d'une corrélation entre modification génomique et un échec thérapeutique existe [113]. L'évaluation de la résistance par les marqueurs moléculaires offre certains avantages, elle permet entre autres choses d'analyser un grand nombre d'échantillons collectés dans divers endroits et de tester leurs sensibilités simultanément à plusieurs antipaludiques. Malheureusement ces techniques demeurent à ce jour d'un coût relativement élevé et ne sont donc pas accessibles à tous les laboratoires surtout des pays en voie de développement.

1.5.1. Des marqueurs moléculaires de résistance

Pertinents et spécifiques pour prédire le degré de résistance d'une population de parasites à tel antipaludique, ils sont de nos jours d'une grande importance dans la surveillance de l'efficacité d'une molécule antipaludique. Il n'existe pas actuellement de marqueurs moléculaires de résistance relatifs à toutes les molécules antipaludiques connues. Néanmoins, nous présentons ci-dessous ceux déjà répertoriés.

1.5.1.1. Marqueurs de résistance aux dérivés quinoléiques

La chloroquine (CQ) est l'une des molécules qui a été le plus utilisée dans la lutte contre le paludisme. Présentant un bon rapport coût-efficacité, elle a commencé à être utilisée après la seconde guerre mondiale et cela pendant près de 30 ans tant dans la prophylaxie que pour le traitement du paludisme jusqu'à l'apparition de souches résistantes en Asie, en Amérique Latine et leur dissémination à tous les continents.

L'apparition des souches résistantes à la CQ fut une terrible catastrophe car elle a entrainé une augmentation de la mortalité [114-115]. Selon Randall Packard, cette résistance initialement survenue dans la région frontalière entre la Thaïlande et le Cambodge, est apparue suite à un usage abusif de la chloroquine (administration indirecte dans du sel, administration de masse) à des doses probablement sub-curatives dans une zone de forte transmission [116].

La CQ est aussi la molécule dont le mode d'action ainsi que la résistance moléculaire ont été le plus étudiés. Certains travaux ont suggéré une implication des gènes codant pour des protéines de transport du parasite [117-122]. Des travaux de biologie moléculaire ont finalement permis d'affiner cette

compréhension en identifiant le gène responsable, le *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter* (*pfcrt*), ainsi que la mutation principale conférant cette résistance (mutation K76T) [123]. Cette mutation dont l'effet se manifeste au sein de la vacuole digestive provoque une altération du gradient de pH, un défaut d'accumulation de la chloroquine et un efflux de la chloroquine vers l'extérieur [124].

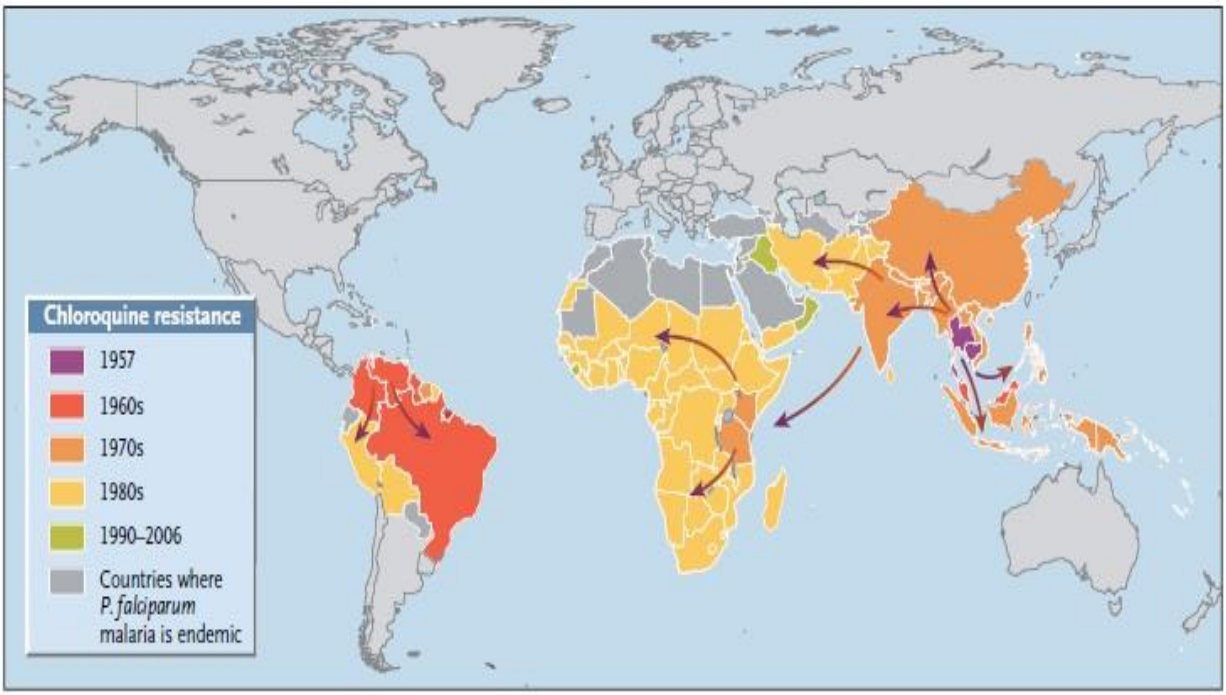


Figure 21. Apparition et expansion de la chloroquinorésistance (du WWARN, www.wwarn.org)

La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance in vivo à la CQ par 7,2 (odds ratio, OR ; intervalle de confiance à 95 %, IC95 % : 4,5-11,5, méta analyse de 12 études) sur un suivi de 28 jours et par 2,1 (OR ; IC95 % : 1,5-3,0, méta analyse de 13 études) sur un suivi de 14 jours [125]. Ceci décrit bien l'importance de l'identification et surtout de la validation d'un marqueur moléculaire de résistance pour les études de surveillance.

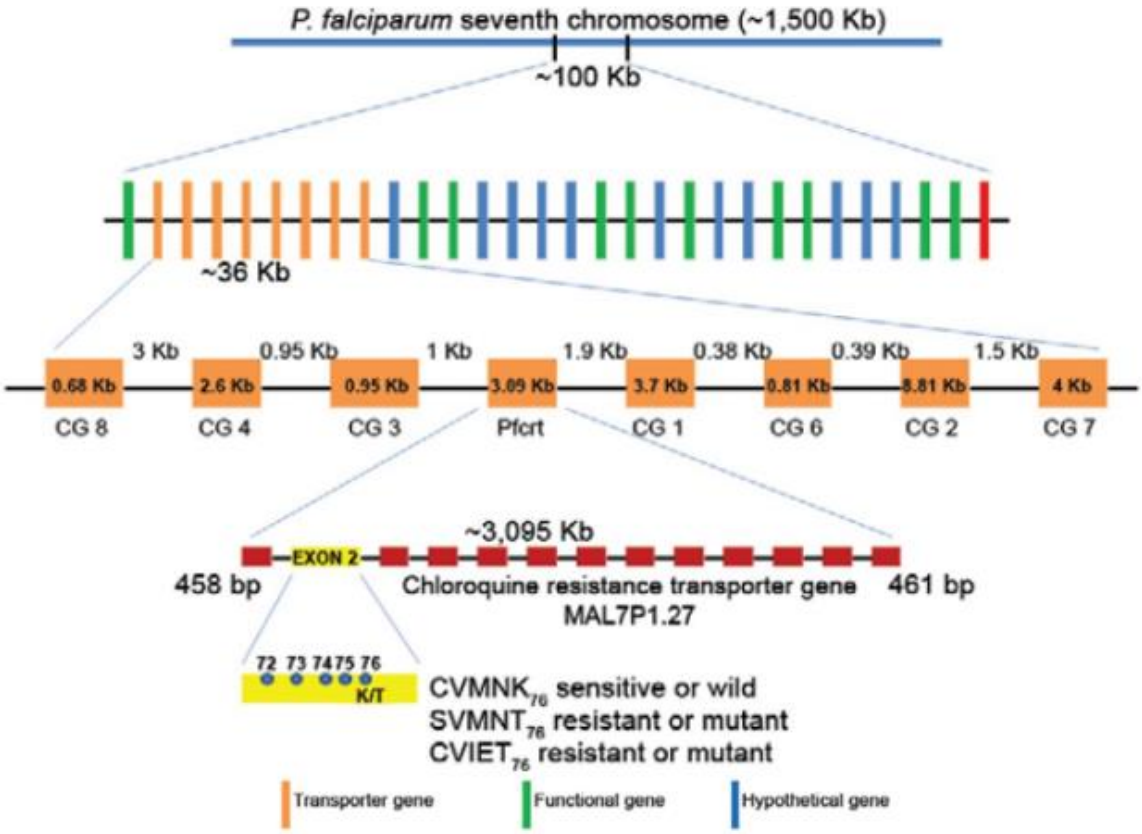


Figure 22. Représentation du chromosome 7 de *P. falciparum* illustrant un segment d'environ 100Kb sur lequel se situent les 8 gènes de transport dont le *Pfcrt*. Le p*fcrt* est mis en exergue avec ses 13 exons ainsi que la mutation K76T. (de Awashi G., Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108(8): 947-961)

D'autres études ont par ailleurs cité le gène *Plasmodium falciparum multi-drug resistance 1(pfmdr1)* en suggérant qu'il modulerait le degré de résistance à la CQ [126-127]. Sur ces deux gènes, les mutations les plus citées sont la K76T sur le *pfcrt* et la N86Y sur le *pfmdr1* [128-129]. Mais de plus en plus, de nouvelles mutations sont découvertes en fonction des lieux et des époques où sont effectuées les études. C'est ainsi que l'on peut par exemple citer pour le gène *Pfcrt* les nouvelles mutations A144F, L148I, I194T, T333S et pour le *pfmdr1* les nouvelles mutations E130K et V1109I découvertes au Cambodge, pour ne citer que celles-là à titre d'exemple [130].

Le *pfmdr1*, comme son nom l'indique, a aussi était suspecté ou carrément impliqué dans la résistance à plusieurs autres molécules antipaludiques, notamment la quinine [131-133], à l'amodiaquine [134], à la méfloquine [135-136], à la pipéraquine [137], à la luméfantrine [131, 138-139], à l'artémisinine seule ou utilisée en combinaison [140-142]. Outre les mutations observées sur ce gène, l'augmentation du nombre de ses copies, probablement survenu lors d'un crossing-over inégal [143], est fortement impliquée dans la résistance à plusieurs antipaludiques. Certains mécanismes permettent Le WorldWide Antimalarial Resistance Network (réseau international sur la résistance aux antipaludiques) ou WWARN a publié à cet effet une procédure standardisée pour évaluer ce nombre de copies [144].

Il apparaît donc que toutes les mutations impliquées dans un phénomène de résistance ne sont jamais définitivement toutes connues. Des recherches continues en des lieux et époques différents permettent d'élargir le champ des connaissances, d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en place et d'adapter les stratégies de lutte.

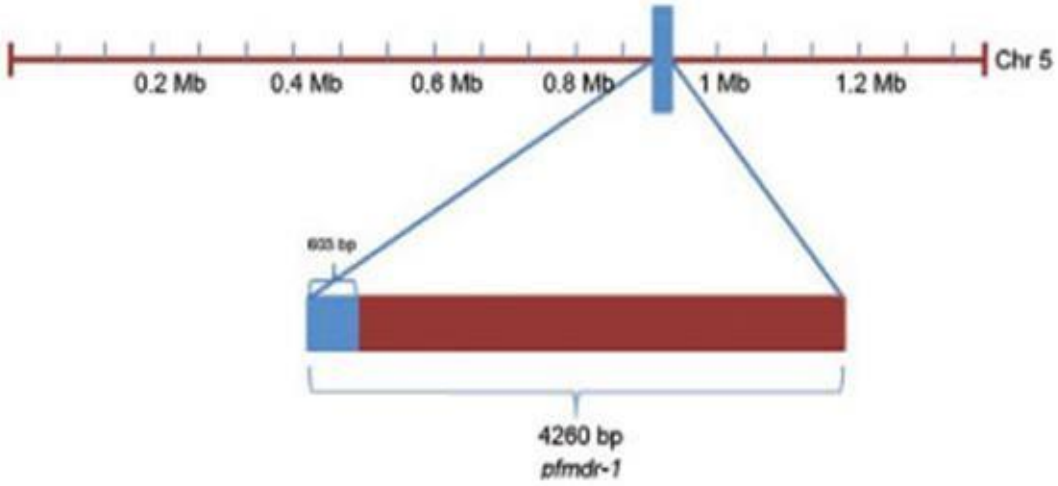


Figure 23: Localisation du *pfmdr1* sur le chromosome 5 de *P. falciparum* (de Sutar D, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2011; 106:1)

Il s'est avéré que la majorité des mutations effectives survenant sur le *pfcrt* se retrouvaient entre les positions des codons 72 et 76, déterminant ainsi différents profils phénotypiques. L'haplotype CVMNK étant celui des parasites classiquement sensibles à la CQ et les haplotypes CVIET, SVMNT, SVIET, CVMNT and CVTNT classiquement répertoriés comme résistants [145].

Warhrust *et al.* ont étudié en 2003 les changements physico-chimiques survenant sur des souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum* portant différents haplotypes en regards des codons 72-76 du *pfcrt.* Ils ont suggéré que la présence de l'haplotype SVMNT modifiait certaines caractéristiques physico-chimiques de la protéine, essentiellement l'hydrophobicité, facilitant ainsi l'efflux du monodeséthylamodiaquine, principal métabolite actif de l'amodiaquine (AQ) hors de la vacuole digestive [146]. Des résultats similaires *in vivo* ont été présentés par Ochong *et al.* toujours en 2003 et par Sa *et al.* en 2009 [147-148]. Beshir *et al.* ont par contre publié des résultats en 2010 stipulant que la seule présence de cet haplotype était suffisante pour conférer de la résistance à l'AQ [149]. Dès lors, l'haplotype SVMNT pouvait être considéré comme marqueur moléculaire de résistance à l'AQ. Identifié initialement en Asie et en Amérique latine [150-151], il est recherché en Afrique où l'AQ, après avoir été utilisée en monothérapie dans certains pays, est aussi actuellement utilisée comme molécule partenaire des CTA. A notre connaissance, cet haplotype n'a été retrouvé que dans 3 pays africains à ce jour: en Tanzanie [152], en Angola [153] et en Ethiopie [154]. Les deux premiers étant des pays frontaliers à la RDC. Deux études réalisées en RDC ont recherché cet haplotype sans le retrouver [155-156].

Néanmoins, la grande superficie de la RDC, ses nombreuses frontières "virtuelles" ainsi que les expériences des antipaludiques précédents plaident en faveur d'une surveillance continue. Une publication discutant de ce sujet a fortement recommandé de surveiller les haplotypes *pfcrt* 72-76 dans les régions impaludées utilisant l'AQ comme molécule partenaire des CTA [157].

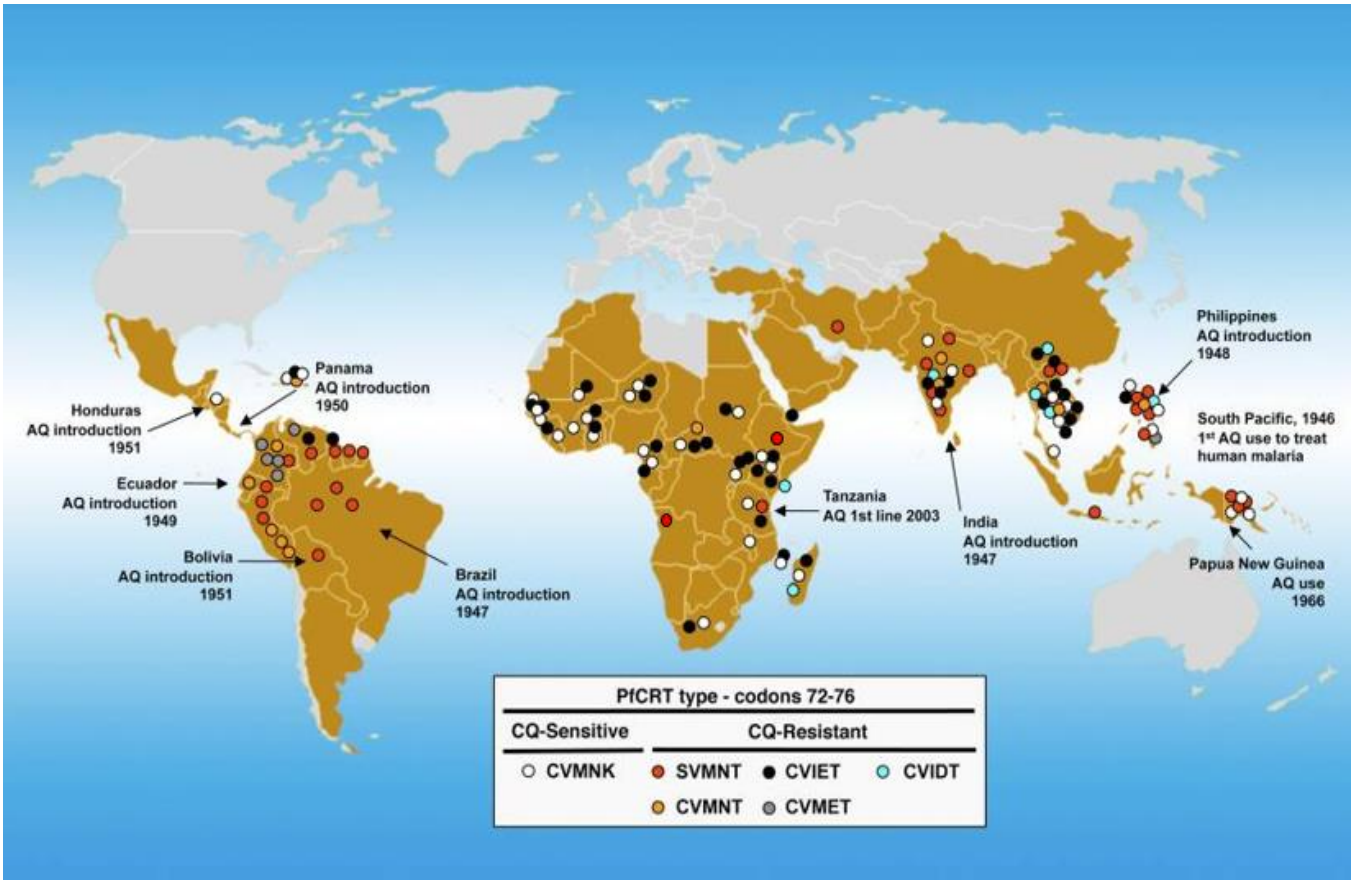


Figure 24. Distributions des haplotypes *pfcrt* (modifié de Sa JM et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(45): 18883–9.)

1.5.1.2. Marqueurs de résistance aux inhibiteurs des acides nucléiques

Pour ce qui est de la résistance aux antifolates (essentiellement la sulfadoxine et la pyriméthamine), deux gènes ont été clairement impliqués à savoir le: *pfdhfr* (chromosome 4) et le *pfdhps* (chromosome 8) pour lesquels les mutations S108N, C59R, N51I et A437G, K540E respectivement, sont les plus citées dans la littérature [158-160].

La présence de la mutation S108N sur le *pfdhfr* multiplie le risque de résistance *in vivo* à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) par 2,2 (OR; IC95 %: 1,4-3,3, méta analyse de 18 études) et la présence de triple mutants (combinaison des 3

mutations S108N, C59R et N51I) multiplie le risque de résistance *in vivo* à la SP par 4,3 (OR; IC95 % : 3,0-6,3, méta analyse de 16 études) [125].

En effet, la seule mutation S108N modifie la configuration de la DHFR et réduit l'affinité de la molécule sans en affecter le fonctionnement vis-à-vis de son substrat naturel et donc des mutations additionnelles potentialisent cette baisse d'affinité pour le dihydrofolate [161-162]. De même, les mutations survenant sur la DHPS en modifient la conformation spatiale et réduisent donc son affinité à la dihydroptéroate [163].

En RDC, une demi dizaine de travaux ont été publiés en rapport avec les gènes *pfdhfr* et *pfdhps* (résistance moléculaire à la SP) [164-168]. L'analyse de ces différentes études révèle des prévalences de mutants résistants parfois très élevées, comme par exemple Cohuet *et al.* qui rapportent plus de 50% de triple mutants sur le *pfdhfr* [165], Mobula *et al.* qui ont décelé 97,9% de parasites présentant la mutation N51I [168] ou encore Swarthout *et al.* rapportant 45,2% de doubles mutants (A437G, K540E) sur le *pfdhps* [166].

1.5.1.3. Marqueur de résistance à l'artémisinine

Lors de l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour la prise en charge des cas de paludisme simple, l'artémisinine (ainsi que ses dérivés) avait une efficacité proche des 100% et aucun cas de résistance à ce produit n'avait alors été rapporté. L'artémisinine a radicalement amélioré le traitement du paludisme et sa découverte a valu le prix Nobel à Youyou Tu en 2015 [169].

En prévision de l'apparition potentielle de souches résistantes à l'artémisinine, des travaux furent entamés afin de comprendre le mode d'action de cette drogue

et le gène codant pour la protéine *pfATPase6* fut identifié comme cible probable de l'artémisinine [170]. Ce gène fut suspecté en 2005 d'être responsable de la résistance *in vitro* à l'artémisinine (avec les mutations S769N et A623E) [171]. Une étude menée au Cambodge et en Thaïlande quelques années plus tard en 2009, révéla une nette baisse de sensibilité de *P. falciparum* à l'artémisinine [172]. La résistance fut ainsi déclarée et l'identification et la validation d'un marqueur moléculaire devint une priorité. A ce jour, ces cas de résistance n'ont été répertoriés qu'en Asie. Plusieurs travaux ont été menés afin de confirmer l'implication du *pfATPase6* dans la survenue de la résistance à l'artémisinine mais les résultats divergent. Tandis que Cui et al. ne trouvent aucune association entre la mutation S769N et la résistance à l'artémisinine [173], Zakeri et al. suggèrent que les mutations sur le *pfATPase6* pourraient fournir des signaux d'alerte précoce pour l'émergence des résistances [174].

En 2014 fut publié la découverte d'un marqueur moléculaire de résistance adopté par l'ensemble de la communauté scientifique. La présence de certaines mutations sur le gène K13 fut fortement corrélée à la résistance à l'artémisinine [175]. De plus en plus d'études à ce jour ont été publiées sur la recherche de ce marqueur en Afrique (où aucun cas de résistance à l'artémisinine n'a encore été formellement répertorié). Les mutations décrites en Asie du sud-est conférant de la résistance à l'artémisinine n'y ont pas encore été retrouvées. Par contre de nouvelles mutations ont été décrites sur ce gène dans certains pays dont la RDC mais aucun lien n'a encore été établi à ce jour entre celles-ci et une résistance clinique. [176-177].

Tableau 2: Gènes impliqués dans la chimiorésistance de *P. falciparum*

Antipaludiques	Gènes impliqués*
Chloroquine	*pfcrt, pfmdr1*
Quinine	*pfcrt, pfmdr1, pfnhe*
Amodiaquine	*pfcrt, pfmdr1*
Méfloquine	*pfmdr1*
Pipéraquine	*pfcrt, pfmdr1*
Luméfantrine	*pfmdr1*
Atovquone	*Pfcyt b*
Sulfadoxine	*Pfdhps*
Pyriméthamine	*Pfdhfr*
Artémisinine	pfATPase6, K13

*gènes mentionnés dans la littérature pour lesquels un lien quelconque a pu être établi (in vitro ou in vivo)

Références

1. Kong YC. Huangdi Neijing: A ***Synopsis with Commentaries***. Hardcover. 2010
2. Babu BV. ***History of malaria and antimalarials.*** RMRC News Bulletin, 2007 ,7:1 (Jan-June)
3. Hawass Z., Gad Y. Z., Ismail S., et al. ***Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family.*** *The Journal of the American Medical Association*. 2010;303 (7):638–647.
4. Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B, Wernsdorfer WH. ***From malaria control to eradication: the WHO perspective***. *Trop Med Int Health*. 2009;**14:**802-9
5. Najera JA, Gonzalez-Silva M, Alonso PL. ***Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969).*** PLoS Med. 2011;8:e1000412

6. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 19 Oct 2015. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1948/
7. Dowdle W. ***The Principles of Disease Elimination and Eradication. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé***, suppl 2, Vol 76, 1998, pp 22-25
8. WHO (1973) Malaria. ***Handbook of resolutions and decisions of the World Health Assembly and the Executive Board***. Volume I, 1948–1972, 1st to 25th WHA and 1st to 50th EB. Geneva: World Health Organization. pp 66–81.
9. Carter R, Mendis KN. ***Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria.*** Clinic. 2002;15:564–594.
10. Mouchet J & Hamon J***. Les problèmes techniques de l'éradication du paludisme en Afrique.*** Cah ORSTOM, Sér Ent Méd, 1963, 33, 39-48
11. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R. ***Imported malaria (1985–95): trends and perspectives.*** Bull World Health Organ. 1999;77:560–566.
12. Legros F, Arnaud A, El Mimouni B, Danis .: ***Paludisme d'importation en France métropolitaine : données épidémiologiques 2001–2004.*** Bull Epidémiol Hebd 2006;32.

    http://www.invs.sante.fr/pmb/invs/(id)/PMB_2784 (accédé le 19/3/2015)

13. Ron H B, Penny EN, Caroline OH. ***Imported malaria among people who travel to visit friends and relatives: is current UK policy effective or does it need a strategic change?*** Malar J. 2015; 14: 149.
14. Mascarello M, Gobbi F, Angheben A, Concia E, Marocco S, Anselmi M, Monteiro G, Rossanese A, Bisoffi Z: ***Imported malaria in immigrants to Italy: a changing pattern observed in north eastern Italy.*** J Travel Med 2009, 16:317–321

15. Askling HH, Bruneel F, Burchard G, Castelli F, Chiodini PL, Grobusch MP, Lopez-Velez R et al. ***European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group on Clinical Parasitology: Management of imported malaria in Europe.*** *Malar J* 2012, **11:**328.
16. Odolini S, Gautret P, Parola P. ***Epidemiology of imported malaria in the Mediterranean region.*** Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012; 4:e2012031.
17. World Health Organization. **World Malaria Report**. Geneva: WHO Press; 2014.
18. World Health Organization. **Stratégie Technique Mondiale De Lutte Contre Le Paludisme 2016– 2030**. Geneva: WHO Press; 2015.
19. Wery M. ***Protozoologie médicale***, Ed. de Boeck Université, 2005
20. Laveran A. ***Nature parasitaire des accidents de l 'impaludisme : description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre.*** Baillière & fils, 1881
21. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1907". *Nobelprize.org.* http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/ consulté le 26 octobre 2015
22. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1902". *Nobelprize.org.* http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ consulté le 26 octobre 2015
23. Cox FEG. ***History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.*** Parasit Vectors. 2010;3:5
24. Fantini B. ***The concept of specificity and the Italian contribution to the discovery of the malaria transmission cycle.*** Parassitologia.1999;41:39–47.
25. Stephens JWW. ***A new malaria parasite of man.*** Ann Trop Med Parasitol. 1922;16:383–388
26. Knowles R, Das Gupta BM. ***A study of monkey-malaria, and its experimental transmission to man.*** Ind Med Gaz 1932;67:301-21.

27. White NF. **Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite**. Clin Infect Dis 2008; 46:172–3.
28. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble. ***Biodiversité du paludisme dans le monde,*** Ed. John Libbey Eurotext, Paris, 2004
29. Siala E, et al. ***Paludisme à Plasmodium malariae, une rechute 20 ans après un séjours en zone impaludée.*** Presse Med. 2005; 34:371–372.
30. Hedelius R1, Fletcher JJ, Glass WF II, Susanti AI, Maguire JD. ***Nephrotic syndrome and unrecognized Plasmodium malariae infection in a US Navy sailor 14 years after departing Nigeria.*** J Travel Med. 2011; 18: 288–291.
31. Gilles HM, Hendrickse RG. ***Possible aetiological role of Plasmodium malariae in __nephrotic syndrome‘‘ in Nigerian children.*** Lancet 1960; i:806–807
32. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. ***Plasmodium malariae and Plasmodium ovale–the —bashful‖ malaria parasites***. *Trends Parasitol*. 2007; **23(6)**:278-83.
33. Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends Parasitol 2006, 22, 353–8.Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. ***In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax.*** J Exp Med 1989, 169, 1795–802
34. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF et al. ***The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood group genotype, FyFy.*** N Engl J Med 1976, 295, 302–4.
35. Carlton JM, Adams JH, Silva JC et al. ***Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax.*** Nature 2008, 455, 757–63.

36. Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, et al. *The global distribution of the Duffy blood group***.** Nat Commun (2011) 2:266.10.1038

37. Handel TM, Horuk R. **Duffy antigen inhibitors: useful therapeutics for malaria?***Trends Parasitol*. 2010; **26**:329-333.

38. B.T. Grimberg, R. Udomsangpetch, J. Xainli, A. McHenry, T. Panichakul, J. Sattabongkot, *et al*. ***Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein*** PLoS Med, 4 (12) (2007), p. e337

39. Chootong P, McHenry AM, Ntumngia FB, Sattabongkot J, Adams JH. ***The association of Duffy binding protein region II polymorphisms and its antigenicity in Plasmodium vivax isolates from Thailand*** *Parasitology International* 2014; 63 (6), pp. 858-864.

40. Ntumngia FB, Barnes SJ, McHenry AM, George MT, Schloegel J, Adams JH. ***Immunogenicity of a synthetic vaccine based on Plasmodium vivax Duffy binding protein region II.*** Clin Vaccine Immunol. 2014. September;21(9):1215–23.

41. *Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, et al.* ***Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a duffy antigen negative population in Western Kenya.*** Am J Trop Med Hyg.2006;75:575–581

42. Menard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbasoa A, et al. ***Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people.*** Proc Natl Acad

Sci U S A (2010)107:5967–71.10.1073/pnas.0912496107

43. Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B et al.. ***Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivax—***

molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Neglect Trop Dis*. 2011; **5**:e1192.

44. Wurtz N, Lekweiry KM, Bogreau H, Pradines B, Rogier C, Boukhary AOMS, Hafid JE, Salem MSOA, Trape J-F, Basco LK, Briolant S: **Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual.** *Malar J* 2011, **10:**336.
45. Duval L, Ariey F. ***Ape Plasmodium parasites as a source of human outbreaks***. Clin Microbiol Infect. 2012;18:528–32.
46. WHO: ***Guidelines for the treatment of malaria.*** Geneva: WHO; 2006
47. Perkins BA, Zucker JR, Otieno J. Jafari HS, Paxton L, Redd SC, Nahlen BL, Schwartz B, Oloo AJ, Olargo C, Gove S, Campbell CC. **Evaluation of an algorithm for integrated management of childhood illness in an area of Kenya with high malaria transmission.** Bull World Health Organ 1997; 75: 33-42.
48. Weber MW, Mulholland EK, Jaffar S, Troedsson H, Gove S, Greenwood BM. **Evaluation of an algorithm for the integrated management of childhood illness in an area with seasonal malaria in the Gambia**. Bull World Health Organ 1997; 75: 25-32.
49. Tarimo DS, Minjas JN, Bygbjerg IC. ***Malaria diagnosis and treatment under the strategy of the integrated management of children illness (IMCI): relevance of laboratory support from the rapid immunochromatographic tests of ICT malaria P.f/P.v and OptiMAL***.*Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95: 437-444.
50. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, Saganda K, Shao J, Kitua A, Olomi R, Greenwood BM, Whitty CJ. **Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study.** BMJ 2004; 329: 1212.
51. WHO: ***Guidelines for the treatment of malaria (2e).*** Geneva: World Health Organisation; 2010.

52. : ***Test.Treat.Track. Améliorer l'accès au diagnostic et au traitement du paludisme et intensifier la surveillance épidémiologique.*** Geneva: World Health Organisation;2012. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/test_treat_track_brochure_fr.pdf?ua=1 Téléchargé le 08/02/2016
53. Payne D. ***Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level.*** Bull World Health Organ. 1988, **12:621**–626.
54. Lecamus JL, Raphenon G. ***Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy using QBC capillary tubes.*** Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86 : 460.
55. Chotivanich K, Silamut K, Day NPJ. ***Laboratory diagnosis of malaria infection-a short review of methods.*** Aust J Med Sci 2006; 27: 11-15.
56. Baird JK, Purnomo, Jones TR***. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes.*** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86:3–5.
57. Reesing HW. ***European strategies against the parasite transfusion risk.*** Transfus Clin Biol 2005; 12: 1-4.
58. Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, Parise M. ***Transfusiontransmitted malaria in the United States from 1963 through 1999.*** N Engl J Med 2001; 344: 1973-1978.
59. Voller A, O'Neill P. ***Immunofluorescence method suitable for large-scale application to malaria.*** Bull World Health Organ. 1971;**45**(4):524–529
60. Manawadu BR, Voller A. ***Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria.***Trans Roy Soc Med Hyg 1978; 72~456-462
61. Noedl H, Yingyuen K, Laoboonchai A, Fukuda M, Sirichaisinthop J, Miller RS. ***Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis.*** Am J Trop Med Hyg. 2006;75:1205–8

62. Shapiro HM, Mandy F. ***Cytometry in malaria: Moving beyond Giemsa.*** Cytometry A 2007;71A:643–645.
63. Grimberg BT, Erickson JJ, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Zimmerman PA. ***Monitoring Plasmodium falciparum growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy.*** Cytometry A 2008;73A:546– 554.
64. McMorrow ML, Aidoo M, Kachur SP. ***Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings–can they find the last parasite?*** Clin Microbiol Infect. 2011;17:1624–1631
65. Kim SH, Nam MH, Roh KH, Park HC, Nam DH, Park GH, Han ET, Klein TA, Lim CS**.** ***Evaluation of a rapid diagnostic test specific for Plasmodium vivax*****.** Trop Med Int Health 2008; 13: 1495-1500
66. McCutchan TF, Piper RC, Makler MT. **Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection.** Emerg Infect Dis 2008; 14: 1750-1752.
67. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, et al. ***A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests.*** PLoS One 2010; 5:e8091.
68. Chien A, Edgar DB, Trela JM: ***Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus.*** J Bacteriol. 1976, 127: 1550-1557.
69. Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996**.** ***Real time quantitative PCR***. Genome Res. 6:986–994.
70. Livak, K. J., S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. ***Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.*** PCR Methods Appl. 4:357–362.

71. Barker RH, Jr, Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF. ***Detection of Plasmodium falciparum infection in human patients: A comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis.*** Am J Trop Med Hyg.. 1989; 41:266–272.

72. Barker Jr RH, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF. ***A simple method to detect Plasmodium falciparum directly from blood samples using the polymerase chain reaction.*** Am J Trop Med Hyg. 1992;46:416–2

73. Wataya Y, Kubochi F, Mizukoshi C, et al. ***DNA diagnosis of falciparum malaria.*** *Nucleic Acids Symposium Series*. 1991;(25):155–156.

74. Sethabur, O., A. E. Brown, S. Panyim, K. C. Kain, H. K. Webster, and P. Echeverria. 1992. ***Detection of Plasmodium falciparum by polymerase chain reaction in a field study.*** J. Infect. Dis. 166: 145–148.

75. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. ***Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections.*** *MolBiochemParasitol* 1993, **58**: 283–292.

76. Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown. 1993. ***High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.*** Mol. Biochem. Parasitol. 61:315–320.

77. GoogleScholar: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&q=Identification+of+the+four+human+malaria+parasite+species+in+field+samples+by+the+polymerase+chain+reaction+and+detection+of+a+high+prevalence+of+mixed+infections.&btnG=&lr=Recherche effectuée le 10 février 2016

78. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K: **Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and speciesspecific real-time PCR assays.***J Clin Microbiol* 2004, **42:**5636-5643.
79. Cnops L, Jacobs J and Van Esbroeck M. ***Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections***. ClinMicrobiol Infect 2011; 17: 1101–1107
80. Tran et al. 2014, a nested real-time PCR assay for the….
81. Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, et al. ***Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes.*** J Clin Microbiol 2011;49:2946–53.
82. Rooney A.P. ***Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans.*** Mol. Biol. Evol. 2004;21:1704–1711.
83. McCutchan TF, de la Cruz VF, Lal AA, Gunderson JH, Elwood HJ, Sogin ML. ***Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from Plasmodium falciparum.*** Mol Biochem Parasitol. 1988 Feb;28(1):63–68.
84. Gardner et al. 2002. ***Genome sequence of the human malaria paraiste P. falciparum***. Nature
85. Hikosaka K, Watanabe YI, Kobayashi F, Waki S, Kita K, Tanabe K. ***Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 Plasmodium species.*** Parasitol Int 2011; 60: 175– 180.
86. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P, Hewitt S, Sochantha T, Socheat D, Rogier C et al. ***Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers.*** Malaria J 2009; 8: 86.

87. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa JM, Bretagne S: ***Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosing Plasmodium falciparum infection in travelers.*** J Clin Microbiol 2011, 49:2191–2195
88. Brown, A. E., K. C. Kain, J. Pipithkul, and H. K. Webster. 1992. ***Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed Plasmodium falciparum and P. vivax infections undetected by conventional microscopy.*** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86:609–612
89. Schriefer, M. E., J. B. Sacci, Jr., R. A. Wirtz, and A. F. Azad. 1991. ***Detection of polymerase chain reaction-amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitoes.*** Exp. Parasitol. 73:311–316
90. Cheronie Shely Stanis, Beng Kah Song, Tock Hing Chua, Yee Ling Lau, Jenarun Jelip. 2015. ***Evaluation of New Multiplex PCR Primers for the Identification of Plasmodium Species Found in Sabah.*** *Turkish Journal of Medical Sciences.*1411-114.
91. Tan T M C, Nelson J S, Ng H C, Ting R C Y, Kara U A K. ***Direct PCR amplification and sequence analysis of extrachromosomal Plasmodium DNA from dried blood spots.*** Acta Trop. 1997;68:105–114.
92. Oguike MC, Betson M, Burke M, et al. ***Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities.*** Int J Parasitol 2011;41:677–83.
93. Chew CH, Lim YA, Lee PC, Mahmud R, Chua KH. ***Hexaplex PCR detection system for identification of five human Plasmodium species with an internal control.*** J Clin Microbiol. 2012;50:4012–4019.
94. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, et al. ***A new real-time PCR for the detection of Plasmodium ovale wallikeri.*** PLoS One 2012;7:e48033.
95. Alemayehu S, Feghali KC, Cowden J, Komisar J, Ockenhouse CF, Kamau E. ***Comparative evaluation of published real-time PCR assays***

for the detection of malaria following MIQE guidelines. Malar J.2013;12:277.

96. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT: ***The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.*** Clin Chem 2009, 55:611–622.
97. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. ***Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR.*** Malar J 2010, 9:370
98. Cnops L, Boderie M, Gillet P, Van Esbroeck M, Jacobs J. ***Rapid diagnostic tests as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR.*** Malar J. 2011;10:67.
99. Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. ***PCR detection of Plasmodium falciparum in human urine and saliva samples.*** Malar J. 2006;5:103.
100. Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, Locke E, Conway DJ: Quantitative detection of Plasmodium DNA in saliva, blood and urine. J Infect Dis 2009, 199:1967–1974.
101. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. ***Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas.*** Nature. 2010;467:420–5.
102. Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, Kuypers F, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y. ***Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu)***. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1108–1114.
103. Meshnick SR. ***Artemisin antimalarials: mechanisms of action and resistance.*** Med Trop 1999; 58 Suppl. 3: 13-17

104. Warhurst DC. ***Antimalarial drug discovery: development of inhibitors of dihydrofolate reductase active in drug resistance.*** Drug Discov Today1998; 3:538 –546.

105. Vaidya AB. ***Mitochondrial physiology as a target for atovaquone and other antimalarials.*** In «Sherman IW. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection ». ASM Press ed, Washington, 1998, pp 355-368

106. Ralph SA., D'Ombrain MC & McFadden GI. ***The apicoplast as an antimalarial drug target***. *Drug Resist Update* 2001; 4,145 -151.

107. Valecha N, Savargaonkar D, Srivastava B, Rao BH, Tripathi SK, Gogtay N, Kochar SK et al. ***Comparison of the safety and efficacy of fixed-dose combination of arterolane maleate and piperaquine phosphate with chloroquine in acute, uncomplicated Plasmodium vivax malaria: a phase III, multicentric, openlabel study.*** Malar J. 2016;15:42.

108. Phyo AP, Jittamala P, Nosten FH, et al. ***Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria: an open-label phase 2 trial.*** Lancet Infect Dis. 2016;16: 61–69.

109. Held J, Supan C, Salazar CL, et al. ***Ferroquine and artesunate in African adults and children with Plasmodium falciparum malaria: a phase 2, multicentre, randomised, double-blind, dose-ranging, non-inferiority study.*** Lancet Infect Dis. 2015;15: 1409–1419.

110. White NJ, Pukrittayakamee S, Phyo AP, Rueangweerayut R, Nosten F, Jittamala P, Jeeyapant A, Jain JP, Lefevre G, Li R, Magnusson B, Diagana TT, Leong FJ: ***Spiroindolone KAE609 for falciparum and vivax malaria.*** N Engl J Med. 2014, 371: 403-410.

111. Kuhen KL, Chatterjee AK, Rottmann M, Gagaring K, Borboa R, Buenviaje J et al. ***KAF156 is an antimalarial clinical candidate with***

potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58:5060–5067.

112. 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
113. Arez AP, do Rosário VE. ***The relevance of molecular markers in the analysis of malaria parasite populations.*** Transbound Emerg Dis. 2008;55:226–232.
114. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, et al. ***Impact of chloroquine resistance on malaria mortality.*** C R Acad Sci III 1998;321:689-97.
115. Trape JF. ***The public health impact of chloroquine resistance in Africa.*** Am J Trop Med Hyg 2001;64(1-2 Suppl):12-7.7
116. Packard RM. The origins of antimalarial drug resistance. N Eng J Med. 2014;371:397-9
117. Pradines B, Pages JM, Barbe J. ***Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance.*** Curr Drug Targets - Infect Disorders 2005;5:411-31.
118. Henry M, Alibert S, Orlandi-Pradines E, et al. ***Chloroquine resistance reversal agents as antimalarial drugs.*** Curr Drug Targets 2006;7:935-48.
119. Henry M, Alibert S, Rogier C, et al. ***Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria.*** Current Topics Med Chem 2008;8:563-78. 4
120. Alibert-Franco S, Pradines B, Mahamoud A, et al. ***Efflux mechanism, a new target to combat multidrug resistant pathogen.*** Current Med Chem 2009;16:301-17.
121. Pradines B, Parquet V, Orlandi-Pradines E. ***ABC transporters in Plasmodium and their involvement in resistance to antimalarial drugs.***

In ABC Transporters in Microorganisms, Ponte-Sucre A. (ed), Caister Academic Press, Wymondham, UK, 2009, 113-28.

122. Pradines B. ***ABC proteins involved in protozoan parasite resistance. In ABC Transporters and Multidrug Resistance***, Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J. (eds), J Wiley & Sons Inc., 2009, 195-238.

123. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, et al. ***Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance.*** Mol Cell 2000;6:861-71.

124. Ecker A, Lehane AM,Clain J,Fidock DA. ***Pfcrt and its role in antimalarial drug resistance.*** Trends Parasitol 2012; 28:504-14

125. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, et al. ***A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria.*** Malar J 2009;8:89.

126. Duraisingh MT, Cowman AF: ***Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance.*** Acta Trop 2005, 94:181-190.

127. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, et al. ***Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum.*** Nature 2000;403:906-9.

128. Didier Menard, Ferdinand Yapou, Alexandre manirakiza, Djibrine Djalle, Marcelle Diane MatsikaClaquin : ***Polymorphism in pfcrt, pfmdr1, dhfr genes and in vitro responses to antimalarials in plasmodium falciparum isolates from Bangui, Central African Republic***, Am.J.Trop.Med Hyg, 75(3), 2006,pp. 381-387

129. Djimdé A, Doumbo Ok, Cortese Jf, Kayentao K, Doumbos et al. – ***A molecular Marker for chloroquine-Resistant falciparum Malaria.*** N Eng J Med, 2001, 344, 257-263.

130. Khim Nimol, Fandeur Thierry, Bouchier Christiane, Ekala Marie-Thérèse, Puijalon Odile: ***Polymorphismes et chimiorésistances de***

Plasmodium falciparum au Cambodge. Médecine et maladies infectieuses 2004, 34 : 61-64

131. Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA: **Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine and artemisinin**. *J Infect Dis* 2006, **194:**528-535.

132. Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, Wellems TE: **Dissecting the loci of low level quinine resistance in malaria parasites.** *Mol Microbiol* 2004, **52:**985-997.

133. Poyomtip T, Suwandittakul N, Sitthichot N, Khositnithikul R, Tan-ariya P, Mungthin M. ***Polymorphisms of the pfmdr1 but not the pfnhe-1 gene is associated with in vitro quinine sensitivity in Thai isolates of* Plasmodium falciparum.** Malar J. 2012;11:7.

134. Holmgren G, Hamrin J, Svard J, Martensson A, Gil JP, Bjorkman A. ***Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa.*** Infect Genet Evol. 2007;7:562–569.

135. Price, R. N., A. C. Uhlemann, A. Brockman, R. McGready, E. Ashley, L. Phaipun, R. Patel, K. Laing, S. Looareesuwan, N. J. White, F. Nosten, and S. Krishna. 2004. ***Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number.*** Lancet **364:**438–447.

136. Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, Day NP, et al. ***Plasmodium falciparum pfmdr1* amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness.** Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1509–1515

137. Veiga MI, Ferreira PE, Malmberg M, Jornhagen L, Bjorkman A, Nosten F, Gil JP. ***Pfmdr1 amplification is related to increased* Plasmodium**

falciparum ***in vitro sensitivity to the bisquinoline piperaquine***. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3615–3619.

138. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. ***Pfmdr1 copy number and arteminisin derivatives combination therapy failure in*** **falciparum** ***malaria in Cambodia.*** Malar J. 2009;8:11.

139. Mungthin M, Khositnithikul R, Sitthichot N, Suwandittakul N, Wattanaveeradej V, Ward SA, et al. ***Association between the pfmdr1 gene and in vitro artemether and lumefantrine sensitivity in Thai isolates of*****Plasmodium falciparum.** Am J Trop Med Hyg. 2010;83:1005–9.

140. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE, 2010 . ***Role of pfmdr1 amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in Plasmodium falciparum.*** *Antimicrob Agents Chemother 54:* 2455 – 2464 .

141. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC, 2000. ***The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin.*** *Mol Biochem Parasitol 108:* 12 – 23.

142. Rodrigues LA, Henriques G, Borges ST, Hunt P, Sanchez CP, Martinelli A, Cravo P. ***Experimental evolution of resistance to artemisinin combination therapy results in amplification of the*** **mdr1** ***gene in a rodent malaria parasite.*** PLoS One. 2010;5:e11593.

143. Nair S, Nash D, Sudimack D, Jaidee A, Barends M, Uhlemann A-C, Krishna S, Nosten F, Anderson TJC. ***Recurrent gene amplification and soft selective sweeps during evolution of multidrug resistance in malaria parasites.*** Mol Biol Evol 2007; 24: 562–573

144. http://www.wwarn.org/sites/default/files/attachments/procedures/MOL05_CopyEstimationPfalciparum_pfmdr1.pdf Accessed on 30th September, 2016.

145. Awasthi G, Satya Prasad GB, Das A: Pfcrt haplotypes and the evolutionary history of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*.*Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012, 107:129-134

146. Warhurst DC. ***Polymorphism in the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of chloroquine sensitivity with the clinical efficacy of amodiaquine.*** Malar J 2003; 2:31.

147. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A: **Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the** *Plasmodium falciparum* **multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69:**184-187.

148. Sa JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, Wellems TE: **Geographic patterns of** *Plasmodium falciparum* **drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine.***Proc Natl Acad Sci U S A* 2009**, 106:**18883-18889.

149. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, Durrani N, Leslie T, Rowland M, Hallett RL: **Amodiaquine resistance in** *Plasmodium falciparum* **malaria in Afghanistan is associated with the pfcrt SVMNT allele at codons 72 to 76.***Antimicrob Agents Hemother* 2010, **54:**3714-3716.

150. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ: **Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in** *Plasmodium falciparum***.** *Nature* 2002, **418:**320-323.

151. Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LMB, Jacobs-Lorena V, McNamara DT, Bockarie MJ, Kazura JW, Kyle DE, Fidock DA, Zimmerman PA: **Evolution of a unique** *Plasmodium falciparum* **chloroquine-resistance phenotype in association with** *Pfcrt*

polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98:**12689-12694.

152. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, Vestergaard LS, Staalsoe T, Jensen AT, Enevold A, Ronn AM, Khalil IF, Warhurst DC, Lemnge MM, Theander TG, Bygbjerg IC: **Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in** *Plasmodium falciparum* **in Tanzania.** *J Infect Dis* 2006, **193:**1738-1741.

153. Gama BE, de Carvalho GA P, LutucutaKosi FJ, de Oliveira NK A, Fortes F, Rosenthal PJ, Daniel Ribeiro CT, da Cruz MD F: *Plasmodium falciparum* **isolates from Angola show the SVMNT haplotype in the pfcrt gene.** *Malar J* 2010, **9:**174.

154. Mekonnen SK, Aseffa A, Berhe N, Teklehaymanot T, Clouse RM, Gebru T, et al. ***Return of chloroquine-sensitive* Plasmodium falciparum *parasites and emergence of chloroquineresistant* Plasmodium vivax *in Ethiopia.*** Malar J. 2014;13:244.

155. Antonia AL, Taylor SM, Janko M, et al. ***A cross-sectional survey of Plasmodium falciparum pfcrt mutant haplotypes in the Democratic Republic of Congo.*** Am J Trop Med Hyg. 2014; 90:1094– 1097

156. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Lelo M, Lengu B, Nani-Tuma S, et al. ***Assessment of* pfcrt *7276 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa. Democratic Republic of Congo.*** Malar J.2013;12:459.

157. Sa JM, Twu O: **Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type.** *Malar J* 2010, **9:**374.

158. Triglia T, Wang P, Sims PF Hyde JE, Cowman AF. 1998. ***Allelic exchange at the endogenous genomic locus in Plasmodium falciparum***

proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. EMBO J, 17:3807-3815.

159. Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. 1988. ***Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria.*** *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9114-9118.

160. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, et al. ***Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next?*** Trends Parasitol 2001;17:582-8

161. Delfino RT, Santos-Filho OA, and Figueroa-Villar JD. ***Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant Plasmodium falciparum dhfr.*** *Biophys Chem* 2002; **98:** 287-300.

162. Siwaraporn W, Sathitkul S, Siwaraporn R, Yuthavong Y & Santi DV. ***Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase.*** Proc Nat Acad Sc USA, 1997, 94, 1124-1129

163. Gregson A, Plowe CV. ***Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates.*** Pharmacol Rev. 2005; 57: 117-145.

164. Alker AP, Kazadi WM, Kutelemeni AK, Boland PB, Tshefu AK & Meshnick SR. ***dhfr and dhps genotype and sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in children with falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo.*** Trop Med Internat Health 2008: 13, 1384–1391.

165. Cohuet S, Bonnet M, van Herp M, van Overmeir C, d'Allessandro U & Guthmann JP. ***Short report: Molecular markers associated with Plasmodium falciparum resistance to sulfadoxine– pyrimethamine in the Democratic Republic of Congo.*** Am J Trop Med Hyg 2006: 75, 152–154.

166. Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, et al. ***Artesunate+amodiaquine and artesunate+sulphadoxine-***

pyrimethaminefor treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: A clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. Trop Med Int Health 2006: 11, 1503–1511.

167. Taylor SM, Antonia AL, Parobek CM, Juliano JJ, Janko M, Emch M, et al. ***Plasmodium falciparum sulfadoxine resistance is geographically and genetically clustered within the DR Congo.*** Sci Rep. 2013: 3,1165.

168. Mobula L, Lilley B, Tshefu AK, Rosenthal PJ: ***Resistance-mediating Polymorphisms in Plasmodium falciparum infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.*** Am J Trop Med Hyg 2009, 80:555–558.

169. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015". https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/tu-facts.html. Accessed on 30th September, 2016.

170. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, et al. ***Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum.*** Nature 2003; 424:957-61.

171. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon OS: ***Resistance of plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of SERCA-type pfATPase6.*** Lancet 2005, 366:1960-1963

172. Arjen MD, François Nosten, Poravuth Yi, Debashish Das, Aung Phae Phyo, Joel Tarning, Khin Maung Lwin, Frederic Ariey, Warunee Hanpithakpong, Sue J. Lee *et al*. ***Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria.*** N Eng Med 2009; 361:455-67

173. Cui L, Wang Z, Jiang H, Parker D, Wang H, Su XZ, Cui L. ***Lack of association of the S769N mutation in*** **Plasmodium falciparum** ***SERCA***

(PfATP6) with resistance to artemisinins. Antimicrob Agents Chemother. 2012, 56 (5): 2546-10.1128.

174. Zakeri S, Hemati S, Pirahmadi S, Afsharpad M, Raeisi A, Djadid ND. ***Molecular assessment of atpase6 mutations associated with artemisinin resistance among unexposed and exposed*** **Plasmodium falciparum** ***clinical isolates to artemisinin-based combination therapy.*** Malar J. 2012;11:373.

175. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. ***A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.*** Nature. 2014; 13:50–55.

176. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, et al. ***Absence of putative artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study***. J Infect Dis. 2015;211:680–8.

177. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, Mumba, Kekre M et al. ***K13-propeller polymorphisms in Plasmodium falciparum parasites from sub-Saharan Africa.*** JID *epub* 2014.

I.5.2. Des données disponibles sur la résistance moléculaire aux antipaludiques en RD Congo

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques utilisés en RDC a été évaluée par différentes méthodes. Le recensement des études ayant porté sur les marqueurs moléculaires a constitué l'essentiel de la première publication de cette thèse, présentée ci-dessous.

En effet, il n'aurait pas été possible de réaliser un travail traitant de la résistance aux antipaludiques sans faire l'inventaire des données existantes. Pour ce faire, nous avons procédé à une recherche bibliographique, en consultant les bases de données et les moteurs de recherche en ligne. Nous avons par la suite effectué un tri des études ne traitant que des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques, en prenant soin d'éviter les doublons c'est-à-dire les études ayant concerné les mêmes échantillons.

Mvumbi *et al. Malar J (2015) 14:354*
DOI 10.1186/s12936-015-0892-z

MALARIA JOURNAL

RESEARCH

Open Access

Falciparum malaria molecular drug resistance in the Democratic Republic of Congo: a systematic review

Dieudonné Makaba Mvumbi[1*], Jean-Marie Kayembe[2], Hippolyte Situakibanza[3], Thierry L. Bobanga[3], Célestin N. Nsibu[4], Georges L. Mvumbi[1], Pierrette Melin[5], Patrick De Mol[5] and Marie-Pierre Hayette[5]

Abstract

Background: Malaria cases were estimated to 207 million in 2013. One of the problems of malaria control is the emergence and spread of *Plasmodium falciparum* strains that become resistant to almost all drugs available. Monitoring drug resistance is essential for early detection and subsequent prevention of the spread of drug resistance by timely changes of treatment policy. This review was performed to gather all data available on *P. falciparum* molecular resistance in DR Congo, as baseline for future assessments.

Methods: The search for this review was undertaken using the electronic databases PubMed and Google Scholar using the terms "malaria", "Congo", "resistance", "molecular", "antimalarial", "efficacy". Articles were classified based on year of collecting, year of publication, sample size and characteristics, molecular markers analysed and polymorphisms detected.

Results: Thirteen articles were included and five genes have been analysed in these studies: *pfcrt*, *pfdhps*, *pfdhfr*, *pfmdr1* and K13-propeller. The majority of studies included were not representative of the whole country.

Conclusion: This systematic review demonstrates the lack of molecular resistance studies in DRC. Only 13 studies were identified in almost 15 years. The MOH must implement a national surveillance system for monitoring malaria drug resistance and this surveillance should be conducted frequently and country-representative.

Keywords: Malaria, DR Congo, Molecular, Drug resistance

Background

Malaria cases were estimated to 207 million in 2013, among with 584,000 deaths, 90 % found in Africa, Democratic Republic of Congo (DRC) and Nigeria together accounting for 40 % of the estimated global total [1]. The absence to date of an effective vaccine leaves us only chemotherapy to fight against *Plasmodium falciparum* infection, the most virulent *Plasmodium* species that infects humans. One of the problems of malaria control is the emergence and spread of *P. falciparum* strains that become resistant to almost all drugs available.

Chloroquine (CQ) was one of the most used molecules in the fight against malaria because of its cost-effectiveness, but just some years after being placed on the market, the first cases of chloroquine resistance emerged in Southeast Asia, then in Latin America before spreading to all endemic areas [2]. Later, this phenomenon was repeated for the other available drugs (proguanil, sulfadoxine–pyrimethamine, halofantrine, mefloquine). To prevent, or at least delay the onset of new resistant strains, WHO recommended in 2001 the use of drugs association and that one of the drugs be an artemisinin derivative [3]. At that time, no artemisinin resistance had been identified yet and many hopes were placed onto artemisinins. Unfortunately, in 2008 Noedl et al. reported evidence of artemisinin resistance in Western Cambodia [4]. To date, artemisinin resistance has spread

*Correspondence: didimvumbi@gmail.com
[1] Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Mvumbi et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

to Thailand, Myanmar, Laos and Vietnam [5–7]. In 2014, Ariey et al. identified a molecular marker for artemisinin resistance [8].

Monitoring drug resistance is essential for early detection and subsequent prevention of the spread of drug resistance by timely changes of treatment policy. There are three possibilities to study drug resistance: in vitro tests, in vivo tests and study of molecular markers [9]. In vivo tests are the gold standard, as involving the three factors (human host, parasite and anti-malarial molecule), but they are difficult to implement and very expensive due to the heavy organizational machinery that must be in place (drugs, monitoring of patients for 24 or 48 days, repeated biological tests, an experienced staff).

In vitro tests allow studying the inhibition of parasite growth in culture subjected to different concentrations of an anti-malarial. Their results do not reflect a real situation where parasites can survive in vivo in presence of an optimal serum concentration of the drug, as they do not consider host immunity or drug pharmacokinetics. These tests are also financially heavy and require live parasites, qualified persons for its implementation and laboratory facilities for in vitro culture. Finally, the study of molecular markers is a good alternative although the factors related to the host and the drugs are not taken into account. They can explore a wide range of markers (previously identified as related to resistance) onto large samples and in punctual manner. So the analysis of molecular markers gives a snapshot of the situation at a given time [10]. In DRC, which is the second largest African country, CQ was widely used for years till its withdrawal in 2002, first replaced by sulfadoxine–pyrimethamine (SP), then by artemisinin-based combination therapy (ACT) [11]. Due to its size, studying malaria resistance in DRC by in vitro or in vivo methods would be very expensive and time-consuming; analysing molecular markers would be a better alternative.

This systematic review was performed to gather all data available on *P. falciparum* molecular resistance in DRC, as baseline for future assessments.

Methods

The search for this review was conducted during November 2014 and was undertaken using the electronic databases Pub Med and Google scholar. The following search terms "malaria", "Congo", "resistance", "molecular", "anti-malarial", "efficacy" were used. Additional results were obtained from the references in the articles identified through the search. Selection criteria were: (a) samples related to malaria infection in DRC; (b) study comprising analysis of one or more malaria resistance molecular marker; (c) original articles, short reports but no review articles. Full-text articles were read to check for selection criteria. An overall of 34 articles has been identified among which 16 were non-molecular studies and 5 were review articles or duplicates (based on same samples). Thirteen articles were finally included. Articles were classified based on year of collecting, year of publication, sample size and characteristics, molecular markers analyzed and polymorphisms detected. Figure 1 shows the search strategy used.

Results

The overall of the articles included in this review were of samples collected from 1999 to 2014 [12–24]. Some of them concerned non-Congolese people but supposed to have been infected in DRC. Five genes have been analysed in these studies: the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene (*pfcrt*), the dihydropteroate synthase gene (*pfdhps*), the dihydrofolate reductase gene (*pfdhfr*), the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 gene (*pfmdr1*) and the K13-propeller gene (*k13*).

The most analysed gene was *pfcrt*, linked to CQ and amodiaquine (AMQ) resistance [25, 26], and it has been studied in seven articles (53.8 %). *Pfdhps*, known to be related to sulfadoxine resistance [27] and *pfdhfr* for which evidence of point mutations conferring resistance to pyrimethamine has been made [28], have been respectively analysed in five (38.4 %) and four articles (30.7 %). Analysis concerning K13-propeller and the *pfmdr1* genes have been found, respectively in two (15.3 %) and one (7.6 %) studies. *Pfmdr1* is correlated to resistance to many drugs as mefloquine (MQ), lumefantrine (LMF), AMQ and may be to artemisinin [29–32] and *k13* is correlated to artemisinin resistance [8]. Table 1 provides a summary of the studies included in the review.

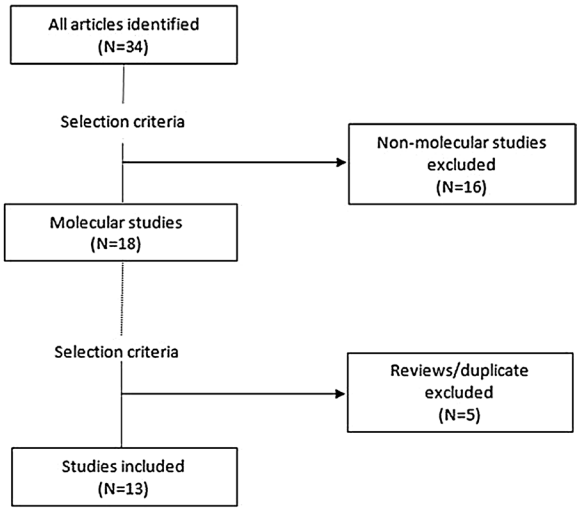


Fig. 1 Search strategy. Twenty-one studies have been excluded after application of selection criteria

Table 1 Summary of the studies included in the review

	Authors	Year of collecting	Year of publication	Sample size[a]	Age	Molecular markers
1.	Andriantsoanirina et al.	1999, 2002, 2005	2010	3	–	pfcrt
2.	Severini et al.	2000	2005	32	–	pfcrt
3.	Wilson et al.	2002	2005	56	6–58 months	pfcrt
4.	Alker et al.	2002	2008	249	6–59 months	pfdhfr, pfdhps
5.	Cohuet et al.	2003–2004	2006	458	–	pfdhfr, pfdhps
6.	Swarthout et al.	2004	2006	168	6–59 months	pfdhfr, pfdhps
7.	Taylor et al.	2007	2013	179	>15 years	dhps
8.	Antonia et al.	2007	2014	180	>15 years	pfcrt
9.	Taylor et al.	2007	2014	151	>15 years	K13
10.	Mobula et al.	2008	2009	142	1–10 years	pfcrt, pfmdr1, pfdhfr, pfdhps
11.	Juliao et al.	2010	2013	12	19–55 years	pfcrt
12.	Mvumbi et al.	2010	2013	145	6–59 months	pfcrt
13.	Kamau et al.	2013–2014	2014	82	>6 years	K13

[a] Considering only samples from DRC, not the total sample size of the study

pfcrt gene

On the seven studies involving the K76T mutation, four have also explored the haplotypes defined by specific mutations at amino acid positions 72–76 (related to AMQ resistance). The main findings of these articles are given in Table 2.

pfdhfr and *pfdhps* genes

Both genes are generally analysed together as they are related to SP combination susceptibility. Only one study analysed the *dhps* gene alone. Most point mutations analysed were on positions 51, 59 and 108 on *dhfr* and on positions 437 and 540 on *dhps*. Prevalence of point mutations found in these studies is presented in Table 3.

K13-propeller gene

Recently linked to artemisinin resistance, this gene has been analysed twice in sample from DRC. The older samples are about 2007 and the recent one is of 2013–2014. None of mutations related to artemisinin resistance discovered in South-East Asia were found in DRC to date. All mutations found are shown in Table 4.

pfmdr1 gene

Only one study analysed this gene in Kinshasa. Five point mutations were explored on codons positions 86, 184, 1034, 1042 and 1046. The N86Y mutation was present in 66.7 % of samples studied [20].

Discussion

During almost 15 years, only 13 molecular studies were conducted based on samples from the DRC. These studies were of samples from 3 to 458 individuals (mean = 142) and that usually were focalized to one or two geographical sites. However, three studies [18, 19, 21] were based on samples collected in the whole country as part of the Demographic and Health Survey (DHS), funded mostly by the international community [33]. Considering the size of the DRC (second largest African country with 2,345,000 km^2) and the different patterns of malaria from one corner to another, results of most of these studies are not generalizable to the nationwide, but must be considered in their local context.

Sometimes for the same molecular markers in the same study, differences are significant in two different

Table 2 Main findings of studies that analysed the pfcrt gene

	Authors	Year of collecting	Haplotypes found	Mutant 76T	
1.	Andriantsoanirina et al.	1999, 2002, 2005	_	3/3	100 %
2.	Severini et al.	2000	CVIET, CVMNT, SVIET	27/27	100 %
3.	Wilson et al.	2002	_	52/56	93 %
4.	Antonia et al.	2007	CVMNK, CVIET, CVMNT, CVMDK	92/166	55.4 %
5.	Mobula et al.	2008	_	88/105	83.8 %
6.	Juliao et al.	2010	CVMNK, CVIET	1/12	8 %
7.	Mvumbi et al.	2010	CVMNK, CVIET	148/198	73.2 %

Table 3 Prevalence of point mutations found in dhfr/dhps genes from included studies

	Authors	Year of collecting	Dhps mutations			Dhfr mutations				Quint. mutant (dhfr and dhps)	Wild		
			A437G	K540E	Double mutants	N51I	C59R	S108N	Triple mutants	–	dhps	dhfr	both
1.	Alker et al.	2002	72 %	67 %	–	>95 %	66 %	>95 %	–	43 %	–	–	1 %
2.	Cohuet et al.	2003–2004	–	–	<20 %	–	–	–	>50 %	0.9–12.8 %	29.4–75.6 %	1–3.9 %	–
3.	Swarthout et al.	2004	0.6 %	–	45.2 %	–	–	3.2 %	46.2 %	27.1 %	30 %	7.6 %	3 %
4	Taylor et al.	2007	–	–	14.6 %	–	–	–	–	–	35.1 %	–	–
5.	Mobula et al.	2008	93.1 %	9.5 %	–	97.9 %	80.7 %	99.1 %	–	–	–	–	–

Table 4 Mutations found on k13 in DRC samples

	Authors	Year of collecting	Mutations found
1.	Kamau et al.	2013–2014	T493T, A578S
2.	Taylor et al.	2007	R471R, G496G, R513R, V520A, A557S, V581V, A617T, V637A

sites. The study of Cohuet et al. [16] illustrates well this fact: the prevalence of *dhps* double mutants (resistance to sulfadoxine) was estimated at less than 1 % in a site (Basankusu) whereas it was close to 20 % in another (Kisangani). This would like to suggest that the molecule remains active in one place while it should be replaced by another. As WHO recommends withdrawal of a drug if the prevalence of resistant is above 10 %, this suggests in that case that the drug should be replaced in one place while it should be maintained in another. This underlines the fact that making national decision about treatment policy could not be based only on "localized" studies. The Ministry of Health should initiate, regularly, anti-malarial drugs efficacy monitoring studies but with a representative sampling. This scarcity of representative studies across the country is a real handicap. Treatment policies are applied in light of the available study (and thus the geographical location concerned). Thus, when changing the SP to ACT in the DRC, one of the studies available to support the selection of the combination AS + AQ compared with AS + SP were localized to one site, Shabunda (East of the DRC) [17]. Maybe if another study was conducted simultaneously in the West of the country, the data would have been different. The main hurdle is generally the high cost of surveillance studies, in particular for molecular studies that require equipment and reagents often unavailable locally. Thus, none of molecular analysis performed for these 13 studies have been performed in a Congolese laboratory. All of the molecular analysis was carried out in Europe or in USA. Another implication of this high cost is that making these studies in a repetitive manner is very difficult. Yet the WHO experts recommend that the surveillance of the resistance must be carried out every 2 years in endemic countries [34].

The various data existing on the *pfcrt* gene confirm the decline of CQ resistant strains after its withdrawal. The latest available figures (which only concern Kinshasa) revealed a prevalence of 73.2 % [23], whereas previous studies before chloroquine replacement in 2002 were giving values beyond 90 % [12–14]. Unfortunately, as mentioned above, it is difficult to correctly compare these studies because of the differences in the applied methodology (essentially the sampling and the study location). It is important to notice that none of the studies concerning the *pfcrt* gene have detected the presence of the SVMNT haplotype (linked to AMQ resistance) in the DRC. As this haplotype was recently found in Angola [35] and Tanzania [36], two countries bordering the DRC, it would be prudent that a continuous and regular monitoring of the occurrence of this haplotype be conducted.

The SP was quickly removed for malaria first-line-treatment in malaria endemic areas when many reports showed strong resistance rates. Studies conducted in the DRC have also confirmed it, but with important inter-sites and inter-studies variations [15–18]. It is not easy to say that SP resistance is declining or increasing because there were not two repetitive studies conducted in the same place, with the same methodology and at different time. Besides, it appears that SP resistance is more pronounced in the East than the West of the DRC. SP is nevertheless still used for intermittent preventive treatment in pregnant women (IPTp) and none of these studies assessed the impact of the use of this molecule in high resistance area.

At the time of the use of ACT, it is very important to monitor the emergence of artemisinin resistant strains in Africa. Indeed, this is the first time that a resistance molecular marker is identified before the resistant strains spreads to all malaria endemic regions. Actually, two studies were related to DRC samples on the *k13-propeller* gene [21, 24]. None of polymorphisms identified in Southeast Asia have been found in the DRC but new mutations on *k13* have been discovered in Africa. Further studies should be conducted to assess the impact of these new mutations on susceptibility to artemisinin.

Conclusion

Only 13 studies were identified in this review and the majority of them were not representative of the whole country. So their results are not generalizable. DRC is a very large country and malaria responses to drugs are very different from one place to another. Ministry of Health must implement a national surveillance system for monitoring malaria drug resistance and this surveillance should be conducted frequently, in many sentinel sites and this especially to react as fast as the occurrence of artemisinin-resistant or AMQ-resistant strains in a part of the DRC.

Authors' contributions

DMM and TB make the web search. DMM and HS drafted the manuscript. JK, CN and GM read full-text articles and reviewed manuscript. MPH and PDM reviewed manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

[1] Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo. [2] Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR

Congo. [3] Department of Tropical Medicine and Infectious Disease, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo. [4] Department of Paediatric, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo. [5] Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium.

Compliance with ethical guidelines

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Received: 27 March 2015 Accepted: 4 September 2015
Published online: 17 September 2015

References

1. WHO. World malaria report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. Wellems T, Plowe C. Chloroquine-resistance malaria. J Infect Dis. 2001;184:770–6.
3. WHO. Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO technical consultation. Geneva: World Health Organization; 2001.
4. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. N Engl J Med. 2008;359:2619–20.
5. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. Lancet. 2012;379:1960–6.
6. Kyaw MP, Nyunt MH, Chit K, Aye MM, Aye KH, Lindegardh N, et al. Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar. PLoS One. 2013;8:e57689.
7. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2014;371:411–23.
8. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505:50–5.
9. WHO. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. WHO/HTM/RBM/2003.50. Geneva: World Health Organization; 2003.
10. WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
11. Kazadi WM, Vong S, Makina BN, Mantshumba JC, Kabuya W, Kebela B, et al. Assessing the efficacy of chloroquine and sulfadoxine–pyrimethamine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Democratic Republic of Congo. Trop Med Int Health. 2003;8:868–75.
12. Andriantsoanirina V, Ménard D, Rabearimanana S, Hubert V, Bouchier C, Tichit M, et al. Association of microsatellite variations of *Plasmodium falciparum* Na+/H+ exchanger (Pfnhe-1) gene with reduced in vitro susceptibility to quinine: lack of confirmation in clinical isolates from Africa. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:782–7.
13. Severini C, Menegon M, Sannella AR, Paglia MG, Narciso P, Matteelli A, et al. Prevalence of pfcrt point mutations and level of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Africa. Infect Genet Evol. 2006;6:262–8.
14. Wilson PE, Kazadi W, Kamwendo DD, Mwapasa V, Purfield A, Meshnick SR. Prevalence of pfcrt mutations in Congolese and Malawian *Plasmodium falciparum* isolates as determined by a new Taqman assay. Acta Trop. 2005;93:97–106.
15. Alker AP, Kazadi WM, Kutelemeni AK, Boland PB, Tshefu AK, Meshnick SR. dhfr and dhps genotype and sulfadoxine–pyrimethamine treatment failure in children with falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo. Trop Med Int Health. 2008;13:1384–91.
16. Cohuet S, Bonnet M, van Herp M, van Overmeir C, d'Allessandro U, Guthmann JP. Molecular markers associated with *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in the Democratic Republic of Congo. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:152–4.
17. Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C. Artesunate + amodiaquine and artesunate + sulphadoxine–pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. Trop Med Int Health. 2006;11:1503–11.
18. Taylor SM, Antonia AL, Parobek CM, Juliano JJ, Janko M, Emch M, et al. *Plasmodium falciparum* sulfadoxine resistance is geographically and genetically clustered within the DR Congo. Sci Rep. 2013;3:1165.
19. Antonia AL, Taylor SM, Janko M, Emch M, Tshefu AK, Meshnick SR. A cross-sectional survey *of Plasmodium falciparum* pfcrt mutant haplotypes in the Democratic Republic of Congo. Am J Trop Med Hyg. 2014;90:1094–7.
20. Mobula L, Lilley B, Tshefu AK, Rosenthal PJ. Resistance-mediating polymorphisms in *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:555–8.
21. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, et al. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. J Infect Dis. 2015;211:680–8.
22. Juliao PC, Sosa S, Gonzalez LD, Padilla M, Ortiz L, Goldman I, et al. Importation of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* by Guatemalan peacekeepers returning from the Democratic Republic of the Congo. Malar J. 2013;12:344.
23. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Mvumbi L, Bobanga L, Situakibanza NT, et al. Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar J. 2013;12:459.
24. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. J Infect Dis. 2015;211:1352–5.
25. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol Cell. 2000;6:861–71.
26. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, Durrani N, Leslie T, Rowland M, et al. Amodiaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Afghanistan is associated with the pfcrt SVMNT allele at codons 72 to 76. Antimicrob Agents Chemother. 2010;12:3714–6.
27. Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. Mol Microbiol. 1997;23:979–86.
28. Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:9114–8.
29. Kim HS, Okuda Y, Begum K, Nagai Y, Wataya Y, Kimura M, et al. Analysis of Pfmdr 1 gene in mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res Suppl. 2001;1:231–2.
30. Sisowath C, Ferreira PE, Bustamante LY, Dahlström S, Mårtensson A, Björkman A, et al. role of pfmdr1 in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. Trop Med Int Health. 2007;12:736–42.
31. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE. Role of pfmdr1 amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:2455–64.
32. Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. J Infect Dis. 2006;194:528–35.
33. The Demographic and Health Surveys Program-Democratic Republic of Congo. 2007. http://dhsprogram.com/publications/publication-FR208-DHS-Final-Reports.cfm. Accessed 17 Nov 2014.
34. World Health Organization (WHO). Surveillance de la résistance aux antipaludiques, Rapport d'une consultation de l'OMS, Genève, Suisse, 3–5 décembre; 2001.
35. Gama BE, Pereira-Carvalho GA, Lutucuta Kosi FJ, Almeida de Oliveira NK, Fortes F, Rosenthal PJ, et al. *Plasmodium falciparum* isolates from Angola show the SVMNT haplotype in the pfcrt gene. Malar J. 2010;9:174.
36. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, Vestergaard LS, Staalsoe T, Jensen AT, Enevold A, Ronn AM, Khalil IF, Warhurst DC, Lemnge MM, Theander TG, Bygbjerg IC. Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania. J Infect Dis. 2006;193:1738–41.

Partie II:

Du diagnostic et de l'épidémiologie moléculaires du paludisme en RDC

II.1. Introduction

En 2015, la RDC a été le deuxième pays africain recensant le plus de cas de paludisme dans le monde (14 millions), juste après le Nigéria et le deuxième pays totalisant le plus de décès imputables au paludisme.

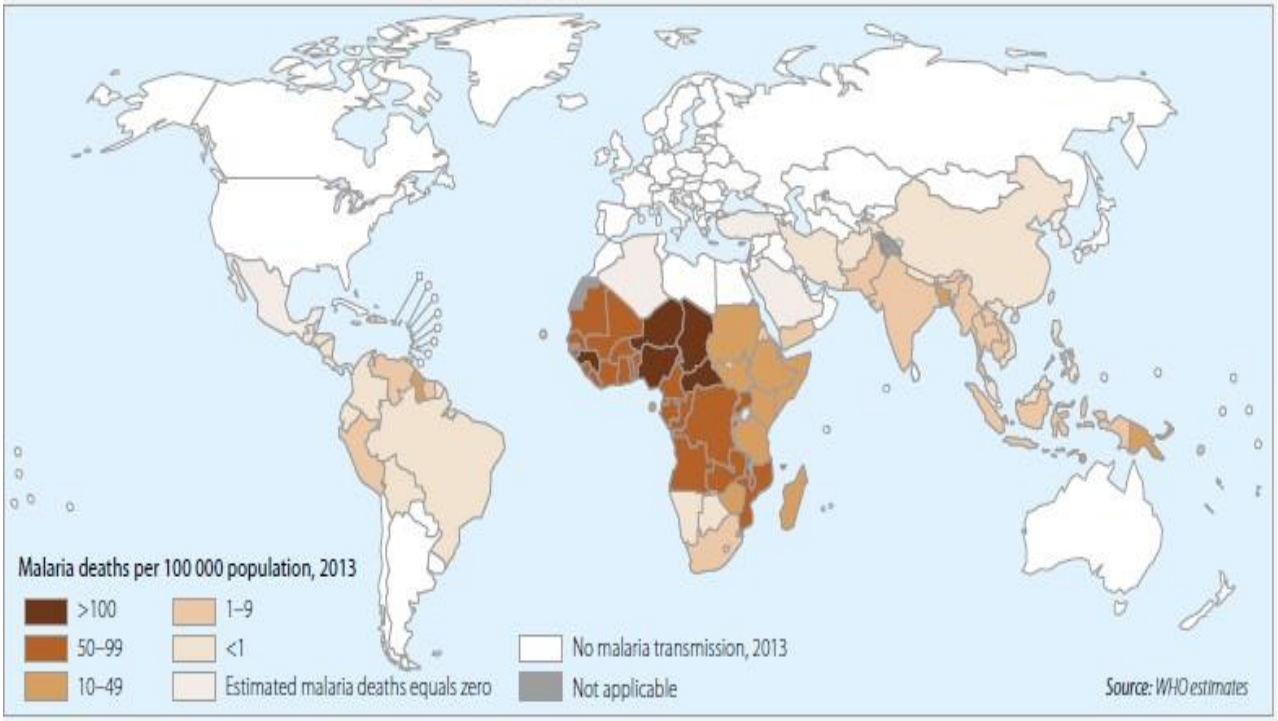


Figure 25. Mortalité du paludisme dans le monde en 2013

Sa situation géographique ainsi que son climat en font un pays aux conditions propices à l'établissement d'un paludisme stable. En effet, la RDC est un pays à forte endémicité palustre dont plus de 95% de la population est exposée toute l'année aux piqures d'anophèles.

Trois faciès épidémiologiques y sont retrouvés: le faciès équatorial, le faciès tropical et le faciès montagnard (Figure 26). Cette notion de faciès qui intègre des caractéristiques climatiques et phytogéographiques permet d'adapter les stratégies de lutte car la situation du paludisme n'est ni homogène, ni uniforme.

Le paludisme y constitue la première cause de consultation et d'hospitalisation. De même il constitue la quatrième cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans.

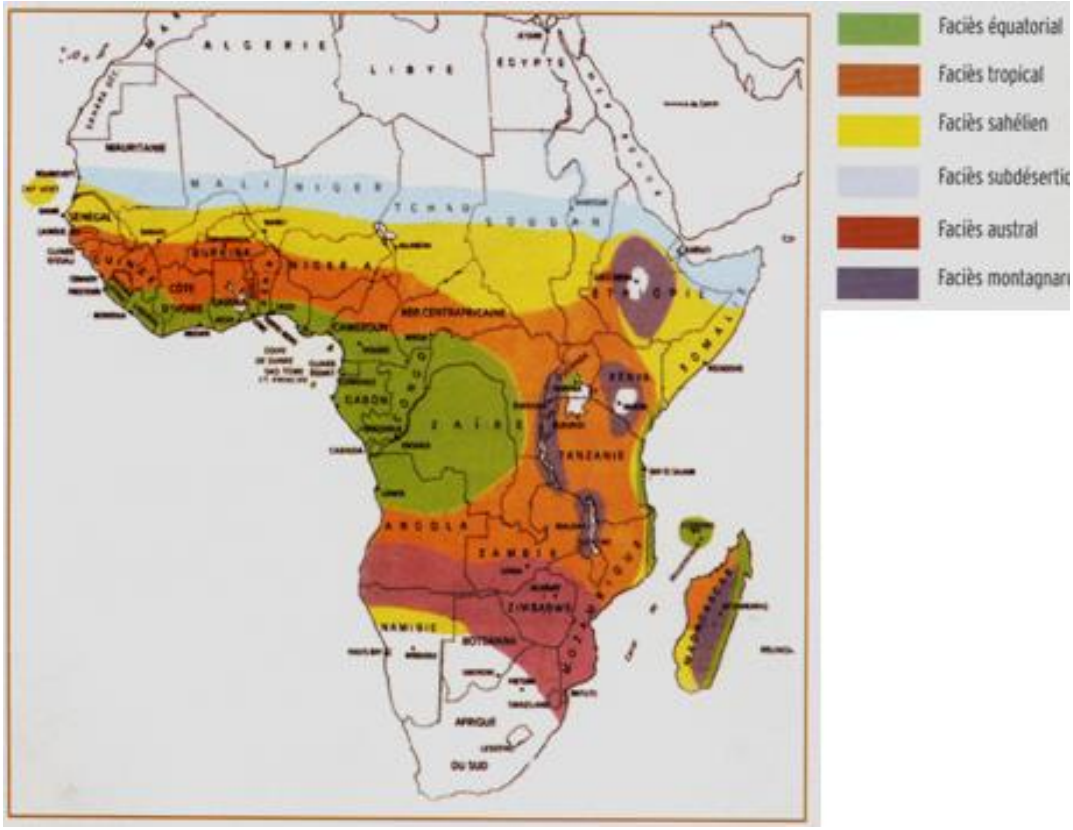


Figure 26. Faciès épidémiologiques (d'après Mouchet J et al. Biodiversité du paludisme dans le monde, 2004. Ed. John Libbey Eurotxt)

En RDC, la majorité des cas sont causés par *P. falciparum*, l'espèce responsable des cas sévères et donc de la quasi-majorité de la mortalité. Le reste des espèces retrouvées sont *P. malariae* et beaucoup plus rarement, *P. ovale* ainsi que *P. vivax.* Les espèces plasmodiales étant souvent confondues à l'examen microscopique (formation de l'examinateur ? infections mixtes ?), l'identification moléculaire demeure la technique permettant un diagnostic de certitude.

La RDC étant un pays très vaste (2è pays africain en termes de superficie), y réaliser des études de prévalence à l'échelle nationale n'est pas chose aisée et généralement c'est avec l'appui des partenaires internationaux que des données de représentativité nationale sont séquentiellement disponibles. Nous pouvons citer à titre d'exemple les

études MICS (Multiple Indicator Cluster Survey) et les EDS (Etudes Démographiques et Sanitaires). Le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) reçoit aussi des données provenant de l'ensemble du pays, via le Système National d'Information Sanitaires (SNIS).

Figure 27. Proportions des infections dues à *P. falciparum* en RDC (du Rapport mondial sur le paludisme en 2015, OMS)

Des sources des données précitées, l'identification du parasite est généralement basée sur la microscopie (lecture des frottis mince et des gouttes épaisses), sur les résultats des TDR et beaucoup plus rarement sur base d'une technique moléculaire (cette dernière approche étant à ce jour la plus sensible mais aussi la plus onéreuse).

Les travaux scientifiques relatifs au paludisme en RDC ayant utilisé une approche moléculaire pour le diagnostic ne concernent généralement que des aires géographiques restreintes. Leurs résultats, non moins importants, ne peuvent donc pas être généralisés à l'ensemble du pays. Ces travaux sont majoritairement fondés sur l'analyse de l'ADN parasitaire extrait à partir de sang total ou déposé sur papier-filtre. Ces méthodes nécessitent un équipement, une logistique et des moyens de

transport (pour le sang total) et de conservation non négligeables. Les gouttes épaisses qui sont réalisées dans presque toutes les structures sanitaires de la RDC et qui sont de conservation relativement facile pourraient être une bonne alternative pour des analyses moléculaires portant sur des grands échantillons provenant de plusieurs sites géographiques.

Au vu des écarts de prévalence non-négligeables retrouvés entre les techniques moléculaires et les autres méthodes diagnostiques (du fait de leur différence de sensibilité) il est juste de supposer que le poids global du paludisme en RDC (portage tant chez les sujets malades que chez les sujets asymptomatiques) est sous-estimé. Le plasmodium sévit donc dans un premier pool représenté par les individus avec manifestations cliniques (constituant le sommet de l'iceberg) et par les sujets asymptomatiques (constituant la partie immergée). Par ailleurs le terme "asymptomatique" est souvent sujet à controverse vu la difficulté de lui attribuer une définition précise en malariologie mais l'on peut s'accorder à dire qu'il se rapporte à un individu afébrile, ne présentant aucun autre signe clinique relatif à un accès palustre mais dont une infection à *Plasmodium* peut être objectivée par un quelconque procédé diagnostique.

Un second pool serait celui d'un réservoir non-humain, essentiellement chez les primates. Il a été récemment rapporté que plusieurs espèces de *Plasmodium* infectant les grands singes d'Afrique étaient très proches génétiquement de ceux retrouvés chez l'homme (cette discrimination est encore une fois tant difficile qu'incertaine sans recours à la biologie moléculaire). Cela suggérerait que même si l'on arrivait à éradiquer toutes les infections plasmodiales chez l'homme, une résurgence serait fortement probable en provenance du réservoir simien. Ce pool n'est donc pas à négliger dans la mise en œuvre des mesures visant à contrôler ou à éradiquer le paludisme.

II.2. Objectifs

1. Evaluer l'utilisation des gouttes épaisses comme source d'ADN plasmodial pour l'identification moléculaire des infections à *Plasmodium* ;
2. Evaluer le poids du portage plasmodial dans la communauté en RDC par un screening moléculaire chez des sujets asymptomatiques;
3. Déterminer par un diagnostic moléculaire les espèces plasmodiales retrouvées en RDC ainsi que leur distribution et déterminer la proportion d'infections attribuables à *P. falciparum;*
4. Rechercher dans un sous-échantillon vivant en zone forestière des infections à *Plasmodium* simiens transmis à l'homme.

Réaliser une quelconque analyse moléculaire sur une espèce vivante requiert l'obtention de son matériel génétique. Pour le cas de *P. falciparum*, coutume est d'extraire son ADN à partir de sang total prélevé des sujets impaludés conservé dans un tube contenant un anticooagulant ou encore déposé et séché sur du papier-filtre. Si l'obtention de ce sang est chose relativement aisée, son transport et sa conservation sont plus ardus.

En effet, le sang requérant certaines exigences techniques dans sa manipulation qui ne sont pas faciles à réunir en Afrique, nous avons pensé à une alternative : utiliser les lames portant gouttes épaisses, qui sont en fait du sang séché et coloré d'une certaine manière sur une lame en verre, comme matériel de départ.
Deux raisons ont orienté ce choix :

1° le diagnostic microscopique, considéré comme le "gold standard", est en principe partout réalisé en RDC,

2° la conservation et le transport des lames sont beaucoup moins contraignants que pour le sang total.

Il nous faut néanmoins rappeler qu'extraire de l'ADN plasmodial à partir de goutte épaisse n'est pas nouveau; cela a déjà été fait. Notre but par contre a été d'évaluer si la quantité et la qualité d'ADN extraite à partir de ce support conviendraient pour réaliser plusieurs analyses sur le même échantillon, à savoir un diagnostic par PCR temps-réel et des analyses sur les marqueurs moléculaires de résistance.

Deux possibilités ainsi s'offraient à nous, en regard de l'appareillage en notre disposition : utiliser le Maxwell® (un automate d'extraction de la firme Promega) ou utiliser le kit d'extraction d'ADN utilisant des colonnes de la firme Qiagen®.

Ces deux firmes n'ayant pas prévu de protocoles particuliers pour extraire de l'ADN à partir de gouttes épaisses, un travail de mise au point a donc dû être fait en amont.

II.3. Etude 2: Comparaison de deux techniques d'extraction d'ADN de *Plasmodium* à partir de gouttes épaisses

Publié dans *Annales africaines de Médecine*, Vol 6, N°2, Mars 2013

Comparaison de deux techniques d'extraction d'ADN de *Plasmodium* à partir de gouttes épaisses

Comparison of two Plasmodium DNA extraction methods from thick blood films

Mvumbi MD*.

Correspondence
Dr Mvumbi Makaba Dieudonné
Tél : 0899849117

Summary

Background. Getting DNA became capital since the emergence of molecular assays. *Plasmodium* DNA is used for malaria diagnosis by PCR, monitoring of molecular resistance or for clinical vaccine trial. DNA is commonly extracted from liquid whole blood or fixed on filter paper. In our study, we investigated two different extraction methods: with the Maxwell® 16 LEV (Promega Corporation, Wisconsin, USA) and with the QiAamp® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) from blood dried and stained on slides known as thick blood films (TBF).
Methods. We made a series of TBFs from a blood sample containing *Plasmodium ovale* (parasitaemia: 1240 parasites/µl), using among 15µl of blood per TBF. We scratched out the TBF and transferred the material to a microcentrifuge tube containing 100 µl of PBS. We used that mixture as sample for our extraction by Maxwell®16 (with LEV blood DNA kit and LEV simply RNA cells kit) and by QiAamp. We quantified the extracted DNA with a spectrophotometer (Nanodrop®) and amplified it by Real-time PCR (RT-PCR). We compared quantity and Ct values for both methods.
Results. *Plasmodium* DNA has been correctly extracted and quantified as well as by Maxwell® than by Qiagen. Extraction with the Maxwell® gave more DNA than Qiagen (12.56 ng VS 3.74 ng) if using LEV blood DNA kit but lower DNA amounts (a less quantity) when using LEV simply RNA cells kit (1,99ng VS 3,74ng). The lowest Ct value has been obtained when using LEV simply RNA cells kit of Maxwell®. Only LEV blood DNA has not given any signal in RT-PCR.
Conclusion. Both methods described in our study achieve the extraction of DNA. However, extraction from TBFs uses lower amounts of blood (50µl) than the extraction from whole blood (200µl). Maxwell seems to be better than Qiagen because extraction is automated and faster with a higher yield. We conclude that TBFs are a reliable source for *Plasmodium* DNA in low income countries where sample transport and preservation are difficult.

Keywords: DNA extraction, *Plasmodium*, real-time PCR.

* Département de Sciences de base

Résumé

Contexte. L'analyse de l'ADN est capitale en biologie moléculaire. Le diagnostic du paludisme, la détection de la résistance aux antipaludiques et les essais de vaccin recourent parfois à l'ADN plasmodial par PCR. L'ADN est généralement extrait du sang total ou de liquide fixé sur le papier filtre. Cette étude évalue deux méthodes d'extraction différentes: avec les 16® LEV Maxwell (Promega Corporation, Wisconsin, USA) et avec le QIAAMP® (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) à partir de sang séché et coloré sur des lames de gouttes épaisses.
Méthodes. Des gouttes épaisses ont été confectionnées à partir d'un échantillon de sang contenant le *Plasmodium ovale* (parasitémie 1240 parasites / pl), en utilisant entre 15 pi de sang par Goutte épaisse. Après grattage des lames, le matériel a été transféré dans un microtube contenant 100 pi de PBS. Le mélange ainsi obtenu a servi d'échantillon pour extraction par un kit Maxwell® 16 (avec LEV kit ADN de sang et LEV simplement ARN kit de cellules) et par QIAAMP. Un spectrophotomètre (Nanodrop®) a permis la quantification de l'ADN et l'amplification obtenue par PCR en temps réel (RT-PCR). Les quantités obtenues, ainsi que les CT ont été comparés pour les deux méthodes.
Résultats. L'ADN plasmodial a été correctement quantifié par les deux techniques ADN *Plasmodium* a été correctement extrait et quantifié comme par (Maxwell® et Qiagen). L'extraction par le Maxwell® a néanmoins fourni plus d'ADN que celle par Qiagen (12,56 ng vs 3,74 ng) lorsque la méthode utilisait le LEV kit d'ADN du sang, mais des quantités d'ADN inférieures en cas d'usage du LEV ARN simple kit des cellules (1,99 ng vs 3,74 ng). La plus faible valeur Ct a été obtenue lors de l'utilisation exclusive du LEV ARN kit de cellules de Maxwell®. L'usage isolé du LEV pour le DNA sur sang total n'a donné aucun signal en RT-PCR.
Conclusion. Les deux méthodes décrites sont efficaces pour l'extraction de l'ADN, avec toutefois de plus faibles quantités de sang pour les gouttes épaisses par rapport au sang total (50 pi vs 200 pi). Le rendement de la technique Maxwell semble cependant supérieur, vue l'extraction automatisée, et la rapidité. La goutte épaisse est donc une source fiable pour l'ADN Plasmodial, surtout dans des conditions de précarité où le transport et la manipulation des échantillons sont laborieux.

Mots-clés: extraction de l'ADN, *Plasmodium*, PCR en temps réel

Introduction

Depuis l'essor de la biologie moléculaire et son impact grandissant dans les sciences du vivant, obtenir de l'ADN devenu capital.
En paludologie, l'ADN plasmodial est utilisé autant pour le diagnostic par PCR (1-3), pour les études moléculaires de la résistance (4) mais aussi pour le suivi dans les essais vaccinaux (5).
Généralement, ce matériel génétique est obtenu à partir de sang total prélevé chez l'hôte humain ou déposé sur papier filtre ou encore, extrait de l'hôte invertébré (anophèles) (6).
Le sang étant un matériel délicat et requérant beaucoup de précautions pour sa conservation, son transport et pour le respect des règles de biosécurité il n'est pas toujours aisé de réaliser des recherches moléculaires dans les pays en voie de développement où les voies de communication entre les sites de prélèvement et les sites de conservation ou d'analyse des échantillons sont parfois inexistantes, difficiles ou très peu praticables. Il en est de même pour les prélèvements effectués sur papiers-filtres qui nécessitent eux aussi certains préalables de conservation et de transport (7).
Le diagnostic microscopique du paludisme restant le gold standard à ce jour, les gouttes épaisses sont confectionnées partout et ne requièrent ni chaîne du froid, ni règles compliquées de sécurité et de conservation.
Nous avons donc envisagé, comme déjà fait antérieurement (8-10), d'utiliser les gouttes épaisses comme moyen de remplacement au sang liquide comme source d'ADN plasmodial.
Le présent travail a consisté à comparer différentes méthodes d'extraction de cet ADN prélevé des gouttes épaisses: d'une part en utilisant le QIAamp® DNA mini kit de Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) et d'autre part l'extraction semi-automatique avec le Maxwell® 16 LEV de Promega (Promega Corporation, Wisconsin, USA) en utilisant le LEV Blood DNA kit et le LEV simply RNA cells kit.

Matériel et méthodes

Confection des lames
A partir d'un échantillon de sang positif à P. *ovale,* provenant du laboratoire de Microbiologie Médicale du CHU de Liège, de parasitémie de 1240 parasites/µl, nous avons confectionné et coloré une série de gouttes épaisses en utilisant environ 15µl de sang par lame.

Grattage des lames
Chaque lame portant goutte épaisse a été placée dans une boîte de pétri stérile et la totalité de la goutte épaisse a été grattée à l'aide d'un bistouri lui aussi stérile. Le produit de grattage a été transféré dans un tube contenant 100µl de PBS, comme décrit par Cnops *et al*. Pour chaque lame, une nouvelle boite de pétri et un nouveau bistouri ont été utilisés afin de réduire le risque de contamination.

Extraction de DNA plasmodial
Nous avons procédé à une extraction avec le QIAamp® DNA mini kit de Qiagen suivant les recommandations du fabricant mais avec certaines modifications des volumes (10).
L'extraction semi-automatique avec le Maxwell® 16 en utilisant le LEV Blood DNA kit et le LEV simply RNA cells kit a été réalisée selon le protocole suivant : en partant de notre produit de grattage dilué dans 100µl de PBS, nous avons ajouté 30 µl de protéinase K ainsi que 300 µl de tampon de lyse. Nous avons vortexer pendant 10 secondes et incubé à 56°C pendant 20 minutes. Le mélange a ensuite été placé dans l'automate, dans le premier puits de la cassette, comme recommandé par le fabricant (11).
L'ADN recueilli a été conservé à -20°C en attendant d'être quantifié puis amplifié.

Quantification de l'ADN
Tous les échantillons de l'ADN extraits ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop®. Pour ce faire, 2µL d'ADN ont suffi pour cette mesure en suivant les instructions du fabricant.

Amplification
Une PCR temps réel diagnostique de *Plasmodium spp* a été réalisée sur un Smartcycler® afin d'obtenir les valeurs moyennes de Ct. Les séquences des amorces et sondes utilisées pour cette PCR sont reprises dans le tableau I. Toutes les PCR ont été lancées en double et en présence de témoins positifs et négatifs. Le contrôle positif interne (IPC) était de l'ADN d'herpès de phoque fourni par la firme Eurogentec (Seraing, Belgique).
Les conditions PCR étaient une dénaturation à 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute (12).

Tableau 1. Sondes et amorces utilisées pour la RT-PCR diagnostic de *P. ovale*

Amorces-sonde	Séquences nucléotidiques	Cible
Plasmo 1 (Fw)	5'ACATGGCTATGACGGGTAACG3'	P. *falciparum, vivax, ovale et malariae*
Plasmo 2 (Rv)	5'TGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCTA3'	
Plas probe	5'TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA3'	

Résultats et discussion

Les différentes méthodes d'extraction sur lames ont été parallèlement effectuées avec les différents volumes de sang total normalement recommandés par le fabricant pour les Kits utilisés (200µl pour le Qiagen et 300µl pour le Maxwell). De même, un volume équivalent à celui ayant servi à confectionner la goutte épaisse (15µl) a été utilisé dans les différentes méthodes.
L'essentiel des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2. Comparaison des volumes, Ct et quantités de DNA selon les différentes méthodes d'extraction employées

Caractéristiques	Qiagen		Max. LEV blood			Max. LEV cell
Vol de départ	200µl	15µl (GE*)	300µl	15µl Sang	15µl (GE*)	15µl (GE*)
Vol d'élution	200µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
Quantification	11,28 ng	3,74 ng	54,33 ng	20,35 ng	12,56 ng	1,99 ng
Ct *Plasmodium*	23,9	30,6	26,4	38,2	0	29,2
Ct T-	34,0	34,9	30,3	33,7	0	30,8

L'ADN a pu être extrait et quantifié tant par la méthode utilisant le kit Qiagen que par l'usage de l'automate Maxwell. Seulement, l'usage du kit LEV blood n'a pas donné de signal à l'amplification, comparativement au kit LEV Cell. Ceci pourrait peut-être s'expliquer du fait de l'interaction des produits servant à la coloration de la lame et de ceux présents dans le kit LEV Cell.
A volume égal de départ (15µl) et d'élution (50µl), l'extraction avec Maxwell a donné une plus grande quantité d'ADN par rapport à l'extraction Qiagen pour le kit Blood mais l'inverse pour le kit Cell.
A l'amplification, la meilleure valeur de Ct (29,2) pour l'ADN extrait des lames a été obtenue avec le kit LEV Cell, bien que ce dernier n'ait donné que très peu d'ADN lors

de l'extraction. Cette valeur de Ct est proche de celle obtenue avec Qiagen (30,6).

Conclusion

Les méthodes d'extractions ci-dessus décrites permettent une extraction de l'ADN suffisante pour les amplifications. Seul le LEV Blood DNA kit n'a donné aucun signal à l'amplification. Des investigations plus poussées permettront d'en connaître la cause. L'utilisation du QIAamp® DNA mini kit de Qiagen a donné une plus grande quantité d'ADN avec une valeur de Ct très proche de celle observée avec le LEV simply RNA cells kit. Ceci laisse supposer que les deux méthodes s'équivalent presque; mais de manière pratique, pour de grands échantillons, l'usage de l'automate Maxwell 16 permettrait un gain notable de temps.

Nous pensons que les gouttes épaisses constituent une alternative au sang total comme source d'ADN dans les pays en voie de développement. Le seul inconvénient serait la faible quantité obtenue, ne permettant pas d'effectuer plusieurs tests sur cet ADN.

Références

1. Snounou G, Viriyakosol D, Jarra W, Thaitong S, Brown NK. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol,* 1993; **58**:283-292.
2. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC et *al.* Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax* and *Plasmodium* ovale for Routine Clinical Diagnosis. *J Clin Microbiol,* 2004; **42**:1214-1219.
3. Dormond L, Jaton-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect,* 2011; **17**:469-475.
4. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi H, Mbacham W, Meshnick S et *al*. World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: Molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J,* 2007; **6**:121.
5. Andrews L, Andersen RF, Webster D et *al*. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:191-198
6. Rider M**,** Byrd B, Keating J, Wesson DM and Caillouet KA. *PCR* detection of malaria parasites in desiccated Anopheles mosquitoes is uninhibited by storage time and temperature. *Malar J,* 2012; 1**1**:193.
7. http://www.wwarn.org/sites/default/files/MOL03CLI06_FilterPaper.pdf
8. Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 1997; **91**: 361-363.
9. Kimura M, Kaneko O, Inoue A, Ishii A, Tanabe K. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from Giemsa-stained thin blood smears. *Mol Biochem parasitol,* 1995*;* **70**: 193-197.
10. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. *Malar J,* 2010, **9**:370.
11. http://www.promega.com/~/media/Files/Resources/ProtCards/Maxwell%2016%20LEV%20simplyRNA%20Blood%20Kit%20Quick%20Protocol.pdf
12. Lee M-A, Tan C-H, Aw L-T, Tang C-S, Singh M, Lee S-H, Chia H-P, and Yap E P. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4343-4345.

Ce travail de comparaison nous a permis de porter un choix judicieux quant à la méthodologie d'extraction d'ADN à adopter. Bien que les gouttes épaisses permettent d'obtenir de l'ADN plasmodial tant en utilisant le Maxwell® que le kit Qiagen®, le volume d'élution (50 µl) n'est pas suffisant pour la réalisation de toutes les analyses que nous avions prévues, à savoir le diagnostic moléculaire (qui utilise 10µl d'ADN par échantillon) et l'analyse des marqueurs moléculaires de résistance (qui requiert aussi 10 µl d'ADN par marqueur étudié, or nous avions prévu d'en analyser trois). A cela il faudrait rajouter un volume complémentaire pour le contrôle de qualité et/ou pour des tests ratés à recommencer.

Nous avons ensuite voulu déterminer s'il serait possible de réaliser un diagnostic moléculaire à partir de cet ADN plasmodial extrait des gouttes épaisses et évaluer si cette technique serait autant ou plus sensible qu'un diagnostic microscopique classique.

Pour cela nous avons collecté aléatoirement des gouttes épaisses déclarées positives et réalisées sur des enfants ayant consulté pour fièvre dans une structure sanitaire de Kinshasa.

La comparaison de ces deux techniques pour le diagnostic est présentée dans la publication ci-après.

II.4. Etude 3: Diagnostic du paludisme sévère confirmé par PCR en temps réel en utilisant la goutte épaisse comme source d'ADN plasmodial comparée à la microscopie à Kinshasa, République Démocratique du Congo

Publié dans *Annales africaines de Médecine*, juin 2015

Diagnostic du paludisme sévère : comparaison de la technique de PCR en temps réel *versus* microscopie, à Kinshasa, République Démocratique du Congo.

Severe malaria diagnosis: comparison of real-time PCR versus microscopy in Kinshasa, DR Congo.

Mvumbi DM[1,2], Boreux R[2], Mvumbi GL[1], Bobanga TL[3], Situakibanza HNT[3], Melin P[2], Kayembe JMN[4], DeMol P[2], Hayette MP[2].

Correspondance
Mvumbi Makaba Dieudonné
Courriel : didimvumbi@gmail.com

Summary

Background: Malaria control stays in the speed and the quality of a rationale diagnosis. Despite being more sensitive among diagnostic tools, PCR is still restricted to specialized laboratories. This study assessed the performance and agreement between a species-specific real-time PCR test based on TBF and the conventional light microscopy for malaria diagnosis. ***Methods:*** Microscopy controls and real-time PCR were performed for *Plasmodium* species identification from 213 blades randomly selected from a Pediatric clinic of Kinshasa. Diagnostic consistency and performance of the 2 methods was assessed using the Cohen's kappa (κ) and by calculating the specificity and the sensitivity. ***Results:*** *P. falciparum* was detected by microscopy in 184/213 samples (86.3%), including one mixed infection. Real-time PCR (RT-PCR)lead to the detection of 202 (94.8%) *Plasmodium*-positive samples and 3 mixed infections. The results of the PCR analysis were consistent with those of microscopy for 195 (91.54%) samples. The later had a sensitivity of 91.09% and a specificity of 100%, compared to PCR. ***Conclusion:*** Even when using TBF as a source of DNA, RT-PCR remains still more sensitive and more accurate than microscopy for detecting mixed infections. Even not yet included as a current diagnosic tool for malaria in low income countries, RT-PCR could find a notable interest in large-scale epidemiological study of drug resistance or malaria parasite's speciation.

Keywords: Malaria, diagnosis, RT-PCR, microscopy

[1] Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo
[2]Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium
[3] Department of Tropical Medicine and Infectious Disease, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo
[4] Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo

Résumé

Contexte : Le contrôle du paludisme dépend de la rapidité et de la qualité d'un diagnostic correct. En depit de sa sensibilite diagnostique superieure à la microscopie, l'usage de la PCR n'est limité à ce jour qu'à quelques laboratoires spécialisés. Cette étude a évalué la performance de la PCR en temps réel pour le diagnostic du paludisme comparée à la microscopie. ***Méthodes :*** Deux cent-treize lames portant des gouttes épaisses ont été aléatoirement sélectionnées du service pédiatrique d'une clinique de Kinshasa. Une identification des Plasmodiums par microscopie et par PCR en temps réel spécifique aux espèces plasmodiales, basée sur de l'ADN extrait à partir des gouttes épaisses, a été réalisée. La performance de la PCR en temps réel et l'accord avec la microscopie ont été évalués a l'aide du test Kappa de Cohen et en calculant la spécificité et la sensibilité. ***Résultats :*** Le *P. falciparum* a été retrouvé sur 184/213 echantillons (86,3%), parmi lesquels une infection mixte. La PCR en temps réel a par contre décelé 202 (94,8%) échantillons positifs à *P. falciparum* dont 3 infections mixtes. Ses résultats étaient en accord avec ceux de la microscopie pour 195 (91,5%) échantillons. La sensibilite de la microscopie, comparée à la PCR était de 91,09% et sa spécificité de 100%. ***Conclusion :*** Même en utilisant les gouttes épaisses comme source d'ADN plasmodial, la PCR en temps réel demeure plus sensible que la microscopie et plus précise pour la détection des infections mixtes. Qouique non encore de pratique routiniere dans les pays en voie de développement, la tecnique de PCR en temps reel peut tirer un net intérêt dans les études épidémiologiques évaluant la chimiorésistance de *P. falciparum* ou pour l'identification des espèces plasmodiales.

Mots clé : Paludisme, diagnostic, PCR en temps réel, microscopie

Introduction

Avec 627 000 décès recensés en 2012 dans le monde (1), le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus meurtrière. La majorité des cas sont comptabilisés en Afrique sub-saharienne où les conditions environnementales sont propices à la croissance et à la survie du vecteur de la maladie, le moustique anophèle.

Historique de l'article : Reçu le 27 janvier 2015 ; Accepté le 11 février 2016

Certaines catégories de personnes sont plus vulnérables que d'autres, telles que les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes, représentants les populations dites à risque (2). Un contrôle efficace du paludisme réside dans la rapidité ainsi que dans la qualité du diagnostic, mais aussi dans une prise en charge médicamenteuse adéquate (antipaludique adapté à la situation, dosage et durée du traitement appropriés). La microscopie, classiquement considérée comme étant le "gold standard" du diagnostic palustre (3-5), ne nécessite pas de matériel sophistiqué ni de source permanente en électricité. Les étalements sanguins sur lame (goutte épaisse et frottis minces) qui sont partout réalisés, sont l'outil de diagnostic le plus approprié pour les pays en développement où le paludisme est souvent endémique.

La goutte épaisse permet de confirmer la présence du parasite et de le quantifier tandis que le frottis mince permet plus facilement d'identifier l'espèce en cause mais aussi les infections mixtes (associations d'espèces) (4, 6). Malheureusement l'interprétation de la microscopie dépend de l'expérience et donc de la subjectivité du microscopiste. Elle permet de détecter environ 10 à 50 parasites/µl, ce qui la rend peu efficace pour des plus faibles parasitémies (7, 8). Elle révèle aussi des insuffisances quant à l'identification des co-infections par différents plasmodiums (9-11).

La préparation, la coloration ainsi que la lecture des lames requiert un temps assez long. Afin d'en économiser, des tests immunochromatographiques dits "rapides" (TDR) ont vu le jour. Ils détectent des enzymes spécifiques au parasite, pLDH et HRP-2 par exemple, et sont donc spécifiques soit au *P. vivax*, soit au *P. falciparum* ou soit aux 4 espèces communes infectant l'homme (12-14). Outre leur rapidité, ils sont d'utilisation et d'interprétation facile. Ils ont cependant une faible sensibilité (variant de 50 à 1000 parasites/µl) (12) et un coût relativement élevé qui compromet leur utilisation en routine, dans quelques contrées de l'Afrique sub-saharienne (13).

Il est actuellement reconnu que le diagnostic par Polymerase Chain Reaction (PCR) est encore plus sensible que les deux procédés précédents. Ce dernier reste encore réservé à certains laboratoires spécialisés, vu ses exigences matérielles et financières (9, 15). La PCR nichée peut détecter jusqu'à 1 parasite /µl (9) et la PCR en temps réel jusqu'à 0,2 parasite /µl (16) voire même 0,02 parasite /µl (17).

Dlamini *et al.* ont suggéré la possibilité d'utiliser les gouttes épaisses pour des études épidémiologiques rétrospectives de résistance aux antipaludiques comme alternative au sang total ou encore déposé sur papiers-filtres (18). En effet, le sang total requiert le respect de certaines règles de biosécurité pour son prélèvement, son transport ainsi que sa conservation souvent difficiles à prendre en compte dans les pays en développement où par contre les gouttes épaisses sont partout confectionnées et le plus souvent conservées. Mais Scopel *et al.* décrivent dans leurs travaux une plus faible sensibilité avec leur PCR nichée en utilisant les gouttes épaisses comme source d'ADN plasmodial (19).

Cette étude a été menée pour évaluer la performance d'une PCR en temps réel (basée sur de l'ADN plasmodial extrait à partir des gouttes épaisses) comparée à la microscopie conventionnelle pour le diagnostic d'espèces plasmodiales, sur des échantillons prélevés chez des enfants avec une symptomatologie associée au paludisme à Kinshasa, en République Démocratique du Congo (RDC).

Méthodes

Collecte des échantillons

Deux cent-treize lames portant gouttes épaisses et frottis minces ont été sélectionnées aléatoirement des archives du service de pédiatrie de la Clinique Saint Marc de Kingasani, à l'est de Kinshasa. Chaque lame portait une goutte épaisse et un frottis mince colorée au Giemsa, réalisés selon les normes de la clinique. Ces échantillons avaient été prélevés

sur des enfants de moins de cinq ans avec symptomatologie palustre durant la période allant de janvier à mars 2010. Une goutte épaisse avait été considérée négative si 100 champs microscopiques étaient dépourvus de parasite. Tous les enfants infectés avaient été traités selon les recommandations de la politique nationale de prise en charge du paludisme. Les lames avaient été stockées dans des boîtes en bois hermétiquement fermées.

Extraction de l'ADN

Toute la surface de la goutte épaisse a été utilisée pour l'extraction d'ADN en utilisant le Kit Maxwell® 16 Cell LEV DNA purification (Promega, USA), comme décrit précédemment par Mvumbi *et al.* (20). L'ADN a été conservé à -20 °C dans l'attente des analyses ultérieures.

PCR en temps réel

La PCR temps réel choisie pour l'identification des *Plasmodium sp.* a été réalisée comme décrit précédemment par Cnops *et al.* (17). Brièvement, une PCR utilisant quatre amorces a été utilisée en duplex incluant deux couples d'amorces sens (Pfal + Pviv et Pmal + Pova) combinés à une seule amorce antisens (plasmo2). Les sondes et les amorces ont été conçues pour détecter les gènes de la petite sous-unité 18S de l'ARNr des espèces plasmodiales (table 1). Le mix était composé de: 12,5 µl de 2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), de 200 nM pour toutes les amorces et sondes à l'exception de *P. vivax* pour lequel les amorces et sonde étaient à 100 nM, 2,5 µl d'amorces et de sonde du contrôle interne et de l'eau pour obtenir un volume total de 25 µl comprenant 5 µl d'ADN.

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur 7500 Fast (Applied Biosystems, USA) dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine, Université de Kinshasa en présence de témoins positifs fournis par l'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers mais aussi par le Laboratoire de Microbiologie clinique du CHU de Liège. Les conditions suivantes de PCR ont été appliquées: 2 min à 95°C, suivi par 50 cycles de 15 s à 95°C et 60 s à 60°C.

Table 1. Séquences des amorces et sondes utilisés pour la PCR temps réel

Espèces	Amorces sens	Amorce antisens (plasmo2)	Sondes
Pfal	5'-CTAGGTGTTGGATG-3'	5'-TTATGAGAAATCAAAGTC TTTGGGTT-3'	5'-FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGA AAGATGACT-DQ-3'
Pova	5'-CGACTAGGTTTTGGATG-3'		5'-VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT-DQ-3'
Pviv	5'-GACTAGGCTTTGGATG-3'		5'-VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCG AAGAGAAAATTCT-DQ-3'
Pmal	5'-GACTAGGTGTTGGATG-3'		5'-FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-DQ-3'

Analyse des données

Les résultats sont présentés sous forme de tables de fréquences pour les variables catégorisées et sous forme de moyennes, écart-type (DS) et extrêmes pour les variables continues. La relation entre la parasitémie et les facteurs continus a été étudiée par un test de corrélation de Pearson. Les taux moyens de parasitémie ont été comparés entre les catégories des autres facteurs par un test t de Student non apparié. La parasitémie a été étudiée en fonction de tous les autres facteurs par une régression linéaire avec une sélection stepwise (pas-à-pas). Les résultats sont considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ($p<0.05$). L'accord entre les deux méthodes de diagnostic a été évalué à l'aide

du kappa (κ) de Cohen dont l'interprétation s'est basée sur l'échelle de Landis et Koch (21). Les performances des deux méthodes diagnostiques ont été évaluées par le calcul de la spécificité et de la sensibilité. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS version 9.3 pour Windows.

Résultats

Un total de 184/213 lames (86,3%) ont été reportées positives par la lecture des frottis minces et gouttes épaisses par un microscopiste expérimenté. La parasitémie a varié de 0,2 à 44,0% avec une moyenne de 17,5%. Toutes les lames ont été positives au *P. falciparum,* mais une d'entre elles l'était également pour *P. malariae* et a donc été catégorisée comme une infection mixte. Par ailleurs, la PCR en temps réel a permis la détection de 202/213 (94,8%) échantillons positifs, tous au *P. falciparum*. Les caractéristiques de base de ces 202 échantillons positifs sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques relatives aux échantillons positifs à la PCR en temps réel

Patients	
Moyenne d'âge ± SD (limites)	30,981±14,21 (4-59)
Hommes	55%
Moyenne Poids (kgs) ± SD (limites)	13,15 ± 4,36 (5-22.4)
Symptômes	%
- Anémie	97
- Prostration	60.9
- Choc	34.2
- Détresse respiratoire	34.2
- Convulsions	5
- Coma	5.4
- Ictère	1.59

P. falciparum a été détecté seul dans 199 échantillons (93,4%) et associé au *P. malariae* dans 3 échantillons (1,4%). Parmi ces trois infections mixtes, une seule avait été également détectée par microscopie. Les résultats du diagnostic sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

Les résultats de la PCR temps réel étaient en accord avec ceux de la microscopie pour 195 échantillons (91,54%), parmi lesquels 184 positifs et 11 négatifs. La microscopie, comparée à la PCR temps réel, a montré une sensibilité de 91,09% (IC à 95%: 86,28%-94,63%) et une spécificité de 100% (95% CI: 71,33 à 100%).

Table 3. Comparison of RT-PCR assay and microscopic thin and thick blood films examination for malaria diagnosis

Microscopie	RT-PCR		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	184	0	184
Négatifs	18	11	29
Total	**202**	**11**	**213**

Kappa=0.52, 95% IC: 0.33-0.70

Table 4. Comparison of RT-PCR assay and microscopy for malaria parasites identification

Microscopie	RT-PCR			Total
	Négatifs	Pfal seul	Mixed (Pfal+Pmal)	
Négatifs	11	16	2	29
Pfal* seul	0	183	0	183
Mixed (Pfal+Pmal**)	0	0	1	1
Total	**11**	**199**	**3**	**213**

Kappa=0.56, 95% IC: 0.39-0.72 *Pfal: *Plasmodium falciparum,* **Pmal: *Plasmodium malariae*

Une forte corrélation a été retrouvée entre la parasitémie et les valeurs de Ct en analyse univariée (voir figure 1), mais aucune association significative n'a été trouvée avec les autres variables.

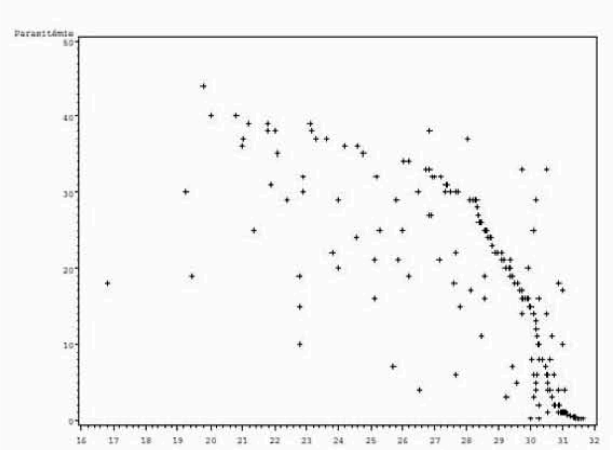


Figure 1. Corrélation entre parasitémie évaluée sur les frottis minces par rapport aux valeurs de Ct de la RT-PCR (r = -0,71, p <0,0001)

Discussion

La majorité des études similaires publiées dans la littérature ont été basées sur des analyses à partir de sang total ou de sang déposé et séché sur papier-filtre comme source d'ADN pour la PCR. La particularité du présent travail réside dans l'usage de la goutte épaisse comme source d'ADN en RDC. Nous avons démontré que la PCR en temps réel utilisée dans cette étude était plus sensible que la microscopie pour détecter tant les faibles parasitémies que les infections mixtes bien qu'étant basée sur des gouttes épaisses. Ceci est en accord avec les résultats de quelques rares études ayant aussi utilisé de l'ADN provenant d'étalements sanguins sur lame pour l'amplification moléculaire (22-25).

Les résultats de la PCR en temps réel étaient en accord avec ceux de la microscopie à 91,54% des cas. Ces chiffres sont proches de ceux de Dormond *et al.* (26) et de Nicastri *et al.* (27) qui ont trouvé, respectivement dans leurs études 89% et 93,5% d'accord entre la microscopie et la PCR en temps réel. Rodulfo *et al.* ont rapporté un accord légèrement plus élevé à 96,2% entre les deux méthodes (28). Mais ces études comparativement à la nôtre ont utilisé du sang total en tant que source d'ADN, qui naturellement a un meilleur rendement pour l'extraction d'ADN.

Une seule une infection mixte a été détectée par microscopie en comparaison des trois détectées par PCR en temps réel. Ceci pourrait être expliqué par le fait que *P. falciparum* est généralement retrouvé en plus grande densité que l'espèce à laquelle il est associé lors d'infections mixtes de sorte que la seconde espèce est occultée (29). D'autre part un microscopiste qui a identifié une première espèce dans son frottis pourrait ne pas rechercher une seconde espèce rare (30). Une autre explication pourrait être donnée par Mueller *et al.* qui ont constaté que le diagnostic moléculaire améliore considérablement la prévalence des quatre espèces de plasmodiums humains, mais avec une plus forte augmentation de *P. malariae* et *P. ovale*, qu'ils ont appelé "parasites timides" du paludisme (31).

Environ 9% des infections positives à la PCR en temps réel n'ont pas été détectées par la microscopie. Ceci est proche des valeurs de l'étude d'Andrade *et al.* qui ont trouvé que 10,3% des infections positives par PCR étaient négatives en microscopie optique. Mais encore une fois, ces travaux étaient basés sur de l'ADN extrait à partir de sang total (32). Outre la possibilité d'une très faible parasitémie (33), l'expérience du microscopiste peut également être incriminée pour expliquer cette non-identification. Mukadi *et al.* ont indiqué dans leur travail sur l'évaluation de la lecture microscopique des frottis sanguins colorés au Giemsa pour le diagnostic du paludisme en RDC que même pour une densité parasitaire de 177000 parasites/µL, 5% des microscopistes avaient répondu « aucun parasite observé » et que si la parasitémie était réduite à 86 parasites/µL, ce pourcentage triplait à 15% pour ceux qui avaient rapporté avoir vu des lames négatives (34). Une autre explication pourrait être la mauvaise qualité des lames. En fait la goutte épaisse et le frottis mince ont été disposés

sur la même lame pour raison d'économie et ont été colorés ensemble. Cette procédure peut expliquer une baisse de la performance de la lecture.

Tous les échantillons positifs à la PCR en temps réel mais qui étaient négatifs à la microscopie avaient une valeur de Ct (cycle threshold) supérieure à 32. Si l'on considère que la parasitémie la plus basse calculée dans notre étude (0,2%) correspondait à une valeur de Ct de 31,63 nous pouvons supposer que ces échantillons avaient des parasitémies inférieures à 0,2%. Ce qui correspond à environ 10.000 parasites/µL qui est bien inférieur aux 177.000 parasites/µL de l'étude de Mukadi *et al.* pour lesquels 5% des microscopistes déclaraient n'avoir observé aucun parasite.

Notre PCR en temps réel a présenté une bonne performance, ce qui rejoint les résultats de Cnops *et al.* (22) qui ont également trouvé 100% de spécificité. Scopel *et al.* (19) rapportent par contre une plus faible spécificité (93%) et sensibilité (65%); ceci pouvant se justifier par les différentes PCR utilisées (amorces, sondes, conditions PCR). Toutefois les deux études ont rapporté des valeurs de Kappa proches (0,57 dans l'étude Scopel et 0,52 dans notre étude) exprimant un accord modéré entre les deux méthodes diagnostiques. Rantala *et al.* qui ont travaillé sur des échantillons d'ADN extraits à partir de sang déposé sur papiers filtres ont trouvé des valeurs assez semblables de 90,9% et 91,2% respectivement pour la sensibilité et la spécificité. Ils ont par ailleurs stipulé que le fait de continuer de considérer la microscopie comme gold-standard pourrait produire des résultats erronés dans les essais cliniques (35).

L'espèce plasmodiale prédominante identifiée tant par la PCR en temps réel que par la microscopie reste *P. falciparum*, telle que décrit par Ngimbi *et al.* il y a près de trente ans (36) et récemment par Taylor *et al.* (37).

Conclusion

Le diagnostic du paludisme par PCR en temps réel est la méthode la plus sensible existant à ce jour quoique requérant du matériel et des réactifs très coûteux. Même lorsque la goutte épaisse est utilisée comme source d'ADN, elle demeure toujours plus sensible que la microscopie et plus précise pour détecter les infections mixtes.

Malgré le fait qu'il ne soit pas encore possible d'inclure le diagnostic moléculaire du paludisme en routine clinique dans les pays à faibles revenus, cette technique pourrait trouver un intérêt considérable dans les études épidémiologiques sur la résistance aux antipaludiques ou sur la spéciation de parasite.

Références

1. WHO: World Malaria Report 2013. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
2. RBM: Regional Strategies.2013. www.rollback malaria.org/gmap/part3.pdf
3. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77**:119-127.
4. Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec. Canada. *J ClinMicrobiol* 2004; **42**: 2694–2700.
5. Eibach D, Traore B, Bouchrik M, Coulibaly B, Coulibaly N, Siby F, Bonnot G, Bienvenu AL, Picot S. Evaluation of the malaria rapid diagnostic test VIKIA malaria Ag Pf/Pan™ in endemic and non-endemic settings. *Malar J.* 2013; **12**:188.
6. Greenwood BM, Armstrong JR. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991, **85**:186-188.
7. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for

research and development. *Lancet Infect Dis* 2002, **2:** 564-573.

8. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988, **12**: 621–626.
9. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993, **58**: 283–292.
10. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C. Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**: 372-376.
11. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004; **364**: 1896-1898.
12. Huong NM, Davis TM, Hewitt S, Huong NV, Uven TT, Nhan DH, Cong le D. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop Med Int Health* 2002; **7**:304-308
13. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Intern Health* 2003 ; **8**:876-883.
14. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LMA, Barral A, Duarte A, Barral-Neto M. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J* 2010, **9:**117.
15. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P, Hewitt S, Sochantha T, Socheat D, Rogier C, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, Ariey F. Towards high- throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. *Malar J* 2009, **8**:86.
16. Hwang SY, Kim SH, Lee GY, Hang VT, Moon CS, Shin JH, Koo WL *et al.* A novel real-time PCR assay for the detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria in low parasitized individuals. *Act Trop* 2011; **120**:40-45.
17. Cnops L, Jacobs J and Van Esbroeck M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections. *ClinMicrobiol Infect* 2011; **17**: 1101–1107.
18. Dlamini SV, Leibrandt J, Dlamini B. Archived giemsa-stained thick-smear blood samples as a source of DNA for plasmodium falciparum detection by the polymerase chain reaction (PCR): an idea for low transmission settings. *J AgrSci Tech* 2011, **14**:1-19.
19. Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2004, **31:**3-8.
20. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Lelo M, Lengu B, Nani-Tuma S, Melin P, Ntumba K, Lunganza K, Demol P, Hayette MP. Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2013, **12**:459.
21. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 1977a, **33**: 159-174.
22. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR. *Malar J* 2010, **9**:370.
23. Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;**91**:361–363
24. Kimura M, Kaneko O, Inoue A, Ishii A, Tanabe K. Amplification by polymerase chain reaction of Plasmodium falciparum DNA from Giemsa-stained thin blood smears. *MolBiochem Parasitol.* 1995; **70:**193–197.
25. Ebrahimzadeh A, Polshakan M, Qureshi MI, Sharifi I. Reliable DNA Extraction on Historical Malaria Negative Smears Conducted to Nested PCR in South-East of Iran. *Biotechnology,* 2006; **5**:353-357.
26. Dormond L, Jaton-Ogay, de Vallière S, Genton B, Bille J and Greub G. Multiplex real-time PCR

for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *ClinMicrobiol Infect* 2011; **17**:469-475.

27. Nicastri E, Bevilacqua N, SañéSchepisi M, Paglia MG, Meschi S, Ame SM, Mohamed JA, Mangi S, Fumakule R, Di Caro A, Capobianchi MR, Kitua A, Molteni F, Racalbuto V, Ippolito G. Accuracy of malaria diagnosis by microscopy, rapid diagnostic test, and PCR methods and evidence of antimalarial overprescription in non-severe febrile patients in two Tanzanian hospitals. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**:712-717.
28. Rodulfo H, De Donato M, Mora R, Gonzalez L, Contreras CE. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res* 2007; **40**:535-543.
29. Snounou G, White NJ. The co-existence of Plasmodium: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 2004; **20**:333-339.
30. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 2004; **20**: 233–240
31. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* 2007; **23:**278-283
32. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, Camargo EP, Camargo LMA, Barral A, Duarte A, Barral-Neto M. Towards a precise test for malaria diagnosi s in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J* 2010; **9:**117.
33. Fontecha GA, Mendoza M, Banegas E, Poorak M, De Oliveira AM, Mancero T, Udhayakumar V *et al.* Comparison of molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras. *Malar J* 2012; **11**:119.
34. Mukadi P, Gillet P, Lukuka A, Atua B, Kahodi S, Lokombe J, Muyembe J and Jacobs J. External quality assessment of malaria microscopy in the Democratic Republic of the Congo. *Malar J* 2011; **10**:308.
35. Rantala AM, Taylor SM, Trottman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, Kulmala T, Ashorn P, Meshnick SR. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J* 2010; **9**:269.
36. Ngimbi NP, Beckers A et Wery M. Aperçu de la situation épidémiologique du paludisme à Kinshasa (République du Zaïre) en 1980. *Ann Soc belge Med Trop* 1982 ; **62** : 121-3.
37. Taylor SM, Messina JP, Hand CC, Juliano JJ, Muwonga J, Tshefu AK, Atua B, Emch M, Meshnick SR. Molecular malaria epidemiology: mapping and burden estimates for the Democratic Republic of the Congo, 2007. *PLoS One* 2011; **6:**e16420.

En regard des résultats fournis par les deux précédents travaux, il est donc clairement apparu que le diagnostic moléculaire du paludisme en utilisant des gouttes épaisses comme source d'ADN parasitaire était possible et plus sensible que la microscopie mais souffrait d'une limite en rapport avec la quantité d'analyses à réaliser.

Nous avons donc opté pour l'utilisation des papiers-filtres pour nos travaux futurs car ces derniers permettent de prélever une plus grande quantité de sang que les gouttes épaisses (et donc d'obtenir une plus grande quantité d'ADN sans altération de celui-ci) et offrent une situation intermédiaire entre le sang total et les gouttes épaisses en termes de conservation et de transport.

Convaincu de ce choix technique (une extraction à l'aide des colonnes Qiagen® à partir de sang déposé sur papier-filtre), nous avons voulu l'appliquer pour la détermination du portage des infections plasmodiales chez des individus asymptomatiques, trop souvent négligés dans les mesures mises en œuvre pour le contrôle du paludisme en zones d'endémie. La RDC étant un pays à forte transmission, la prémunition de la population contribue à favoriser la présence de parasites dans l'organisme sans pour autant le développement de signes cliniques. En effet ces individus ne consultant point dans des structures sanitaires, ne sont ni diagnostiqués ni encore moins traités.

Nous avons aléatoirement sélectionné des individus dans six différentes aires géographiques en tenant compte des différents faciès épidémiologiques, reflets des diverses dynamiques de transmission, à partir desquels des prélèvements sanguins déposés sur papiers-filtres ont été réalisés pour analyses. Cette étude fait l'objet de la troisième publication de cette thèse.

II.5. Etude 4: High prevalence of falciparum malaria in asymptomatic individuals in Democratic Republic of Congo

Publié dans *Malaria Research and Treatment*, Janvier 2016

Hindawi Publishing Corporation
Malaria Research and Treatment
Volume 2016, Article ID 5405802, 4 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2016/5405802

Research Article

High Prevalence of *Plasmodium falciparum* Infection in Asymptomatic Individuals from the Democratic Republic of the Congo

Dieudonné Makaba Mvumbi,[1,2] Thierry Lengu Bobanga,[3] Pierrette Melin,[2] Patrick De Mol,[2] Jean-Marie Ntumba Kayembe,[4] Hippolyte Nani-Tuma Situakibanza,[3,4] Georges Lelo Mvumbi,[1] Célestin Ndosimao Nsibu,[5] Solange Efundu Umesumbu,[6] and Marie-Pierre Hayette[2]

[1] *Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, P.O. Box Kin XI, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo*
[2] *Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liege, 4000 Liege, Belgium*
[3] *Department of Parasitology and Tropical Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, P.O. Box Kin XI, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo*
[4] *Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, P.O. Box Kin XI, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo*
[5] *Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Kinshasa, P.O. Box Kin XI, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo*
[6] *National Malaria Control Program, P.O. Box Kin XI, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo*

Correspondence should be addressed to Dieudonné Makaba Mvumbi; didimvumbi@gmail.com

Received 23 September 2015; Revised 20 November 2015; Accepted 29 December 2015

Academic Editor: Sasithon Pukrittayakamee

Copyright © 2016 Dieudonné Makaba Mvumbi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Malaria remains a major public health problem in the Democratic Republic of Congo (DRC) with 14 million cases reported by the WHO Malaria Report in 2014. Asymptomatic malaria cases are known to be prevalent in endemic areas and are generally untreated, resulting in a significant source of gametocytes that may serve as reservoir of disease transmission. Considering that microscopy certainly underestimates the prevalence of *Plasmodium* infections within asymptomatic carriers and that PCR assays are currently recognized as the most sensitive methods for *Plasmodium* identification, this study was conducted to weigh the asymptomatic carriage in DRC by a molecular method. Six provinces were randomly selected for blood collection in which 80 to 100 individuals were included in the study. Five hundred and eighty blood samples were collected and molecular diagnosis was performed. Globally, almost half of the samples collected from asymptomatic individuals (280/580; 48.2%) had *Plasmodium* infections and the most species identified was *P. falciparum* alone in combination with *P. malariae*. The high prevalence reported here should interpellate the bodies involved in malaria control in DR Congo to take into account asymptomatic carriers in actions taken and consider asymptomatic malaria as a major hurdle for malaria elimination.

1. Introduction

Malaria is a parasitic disease caused by *Plasmodium* species transmitted to man by a mosquito bite [1]. Four *Plasmodium* species infect human but *Plasmodium falciparum* is responsible for the major morbimortality. Infection with *P. falciparum* can result in a simply asymptomatic carriage, uncomplicated or severe malaria. In fact, there is an exposure-related immunity in malaria that could explain these different expressions [2].

In high transmission settings, symptomatic malaria is often concerning children below five years as they have

not been for long time exposed to the parasite and asymptomatic infections generally concern adults that acquired an antidisease and/or an antiparasite immunity during their exposure time [3–6]. Asymptomatic malaria cases are known to be prevalent in endemic areas [7–9] and are generally untreated, resulting in a significant source of gametocytes that may serve as reservoir of disease transmission [10].

The Democratic Republic of the Congo (DRC) is the second largest country in Africa and has a population that is estimated to be 75.5 million people. It is estimated that 97% of the population live in zones with stable transmission. In the WHO malaria report for 2014, 14 million of malaria cases were reported in DRC [11]. Some studies conducted in DRC revealed significant prevalence of asymptomatic *Plasmodium* carriers. Matangila et al. reported a prevalence of 21.6%, 27.4%, and 29.5% of asymptomatic *P. falciparum* infection in pregnant women in Kinshasa, respectively, by microscopy, Rapid Diagnostic Tests (RDTs), and PCR [12]. Maketa et al. found a prevalence of *Plasmodium* infection in asymptomatic children of 30.9% and 14.3% in two areas of Kinshasa, based on microscopic identification of thick blood smears [13]. The most recent available data are from a countrywide study that reports a prevalence of *Plasmodium* infection, in asymptomatic children less than five years, of 23% and 31%, respectively, determined by microscopy and RDT [14]. But Tiono et al. showed in their work that RDTs have some limits in detecting asymptomatic carriers of *P. falciparum* [15].

Currently, Polymerase Chain Reaction (PCR) assays are the most sensitive manner to detect *Plasmodium* DNA [16, 17] and it detects only viable *Plasmodium* [18]. Some PCR assays can detect less than 1 parasite/μL as the technique validated by Cnops et al. [19].

Discrepancies have been often found between microscopy and PCR results for the determination of asymptomatic *Plasmodium* carriage. For example, Baliraine et al. reported 20.7% difference (12.6% by microscopy and 33.3% by PCR) [20], Dal-Bianco et al. found 25% difference (27% by microscopy and 52% by PCR) [21], and May et al. showed 19% difference (48.9% by microscopy and 67.9% by PCR) [22].

We conducted this study to assess the weight of asymptomatic carriage of *P. falciparum* in the DRC, based on a highly sensitive RT-PCR assay for malaria parasite identification.

2. Materials and Methods

2.1. Study Sites and Participants. We randomly identified health areas within 6 provinces of the DRC with different malaria transmission dynamics: Bolenge in Equateur, Luzizila in Kinshasa, Mweka in Kasai-Occidental, Butembo in Nord-Kivu, Punia in Maniema, and Kapolowe in Katanga Province. This household survey recruited one hundred individuals per province, except for Maniema where only 80 individuals could be included. Every age and sex was taken into account after being given an informed consent by adults and parents/guardians of children. People with fever or other malaria related symptoms were not included in this study. Samples were collected during the period from March to November 2014.

2.2. Blood Collection and DNA Extraction. Five hundred and eighty blood samples were obtained from finger prick and dropped on filter paper (Whatman 3MM®) that were dried and stored into individual plastic bags with desiccant. *Plasmodium* DNA has been extracted using the QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen Benelux, Venlo, Netherlands) according to manufacturer's recommendation. Briefly, 3 circles of approximately 3 mm diameter were punched out from a blood spot and placed into a 1.5 mL microcentrifuge tube in which 180 μL of buffer ATL was added. The final elution volume was 150 μL. Each dried blood spot was treated individually into a sterile petri dish to avoid contamination. One negative control (sterile water) was included for each dozen of blood spots treated. DNA was stored at −20°C till further analysis.

2.3. Parasite Identification by Real-Time PCR. A real-time PCR having a sensitivity varying from 0.02 to 0.006 parasites/μL for human *Plasmodium* species identification was run, as previously described by Cnops et al. [19]. PCR tests were run on a light cycler 480 instrument (Roche®) and in the presence of positive controls (provided by the Parasitology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, and the Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège). PCR conditions were as follows: 2 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C.

2.4. Ethical Considerations. This study has received the ethical approbation of the Ministry of Public Health of the DRC and of the Institutional Committee of the Faculty of Medicine, University of Kinshasa.

3. Results and Discussion

P. falciparum was correctly identified in 280 samples (48.2%) among which 6 infections were mixed (*P. falciparum* + *P. malariae*). Prevalence of positive samples by age groups is represented in Table 1. The other human *Plasmodium* species *P. ovale* and *P. vivax* were not found. The real-time PCR cycles thresholds (Ct) vary from 21.72 to 39.23.

Prevalence of *P. falciparum* infection by province was 51% for Equateur, 62% for Kinshasa, 31% for Kasai-Occidental, 22% for Nord-Kivu, 63.7% for Maniema, and 63% for Katanga, as shown in Figure 1.

4. Conclusion

Efforts to control or to eradicate malaria should take into account asymptomatic *Plasmodium* carriers because elimination of parasites in only symptomatic patients will not be enough as long as the pool of asymptomatic carriers will continue to act as a parasite reservoir [23]. Some researchers have suggested to screen and to treat asymptomatic carriers with an Artemisinin-based combination as part of a surveillance strategy towards malaria elimination [24, 25].

The high prevalence of *Plasmodium* infections in asymptomatic carriers found in this study stressed the importance

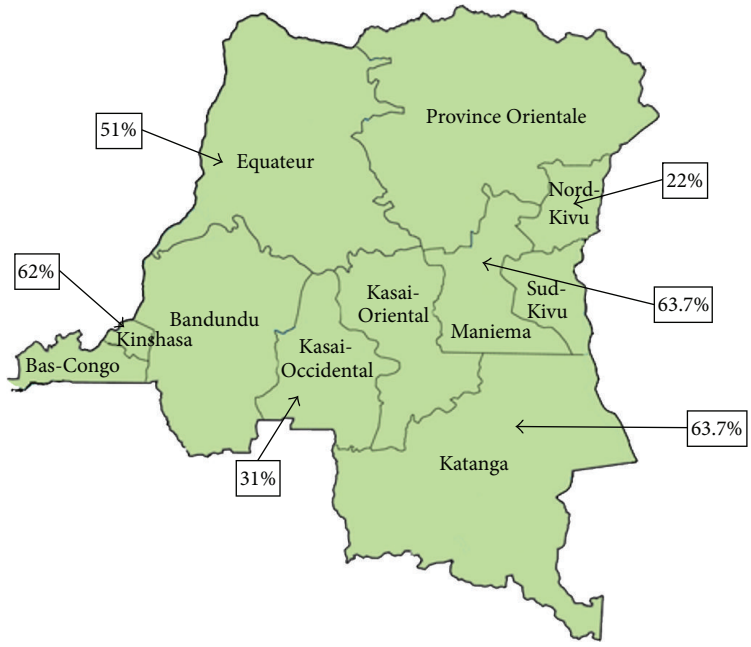


Figure 1: Prevalence of *P. falciparum* infection by collection sites based on a RT-PCR assay.

Table 1: Prevalence of *Plasmodium* infections by age groups in the six DRC provinces.

Study sites	Age groups 0–5 *N* (%)	6–15 *N* (%)	16–59 *N* (%)	>60 *N* (%)	Total
Equateur	15 (29.4)	15 (29.4)	21 (41.1)	0 (0)	**51**
Kinshasa	7 (11.3)	10 (16.1)	45 (72.5)	0 (0)	**62**
K-occ	3 (9.6)	6 (19.3)	20 (39.2)	2 (6.4)	**31**
Kivu	2 (9.1)	5 (22.7)	15 (68.1)	0 (0)	**22**
Punia	4 (7.8)	6 (11.7)	37 (72.5)	4 (7.8)	**51**
Katanga	13 (20.6)	26 (41.2)	21 (33.3)	3 (4.7)	**63**
Total	**44 (15.7)**	**68 (24.2)**	**159 (56.7)**	**9 (3.2)**	**280**

K-occ = KasaÏ-occidental.

of including this item in malaria control programs by the DRC Ministry of Health.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

[1] N. J. White, S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu, and A. M. Dondorp, "Malaria," *The Lancet*, vol. 383, no. 9918, pp. 723–735, 2014.

[2] D. L. Doolan, C. Dobaño, and J. K. Baird, "Acquired immunity to malaria," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 13–36, 2009.

[3] M. P. Grobusch and P. G. Kremsner, "Uncomplicated malaria," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 295, pp. 83–104, 2005.

[4] K. P. Day and K. Marsh, "Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*," *Immunology Today*, vol. 12, no. 3, pp. A68–A71, 1991.

[5] R. W. Snow, J. A. Omumbo, B. Lowe et al., "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa," *The Lancet*, vol. 349, no. 9066, pp. 1650–1654, 1997.

[6] M. Vafa, M. Troye-Blomberg, J. Anchang, A. Garcia, and F. Migot-Nabias, "Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants," *Malaria Journal*, vol. 7, article 17, 2008.

[7] E. Bottius, A. Guanzirolli, J.-F. Trape, C. Rogier, L. Konate, and P. Druilhe, "Malaria: even more chronic in nature than previously thought: evidence for subpatentparasitemia detectable by PCR," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 90, no. 1, pp. 15–19, 1996.

[8] J. F. Trape, A. Zoulani, and M. C. Quinet, "Assessment of the incidence and prevalence of clinical malaria in semi-immune children exposed to intense and perennial transmission," *American Journal of Epidemiology*, vol. 126, no. 2, pp. 193–201, 1987.

[9] T. Smith, J. D. Charlwood, J. Kihonda et al., "Absence of seasonal variation in malaria parasitaemia in an area of intense seasonal transmission," *Acta Tropica*, vol. 54, no. 1, pp. 55–72, 1993.

[10] F. P. Alves, L. H. S. Gil, M. T. Marrelli, P. E. M. Ribolla, E. P. Camargo, and L. H. P. Da Silva, "Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon," *Journal of Medical Entomology*, vol. 42, no. 5, pp. 777–779, 2005.

[11] World Health Organization, *World Malaria Report*, WHO Press, Geneva, Switzerland, 2014, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/.

[12] J. R. Matangila, J. Lufuluabo, A. L. Ibalanky, R. A. Inocêncio da Luz, P. Lutumba, and J.-P. Van Geertruyden, "Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection is associated with anaemia in

pregnancy and can be more cost-effectively detected by rapid diagnostic test than by microscopy in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo," *Malaria Journal*, vol. 13, article 132, 2014.

[13] V. Maketa, H. Mavoko, R. da Luz et al., "The relationship between *Plasmodium* infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo," *Malaria Journal*, vol. 14, no. 1, p. 83, 2015.

[14] Demographic and Health Survey, Democratic Republic of Congo, 2014, http://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/FR300/FR300.pdf.

[15] A. B. Tiono, A. Ouédraogo, A. Diarra et al., "Lessons learned from the use of HRP-2 based rapid diagnostic test in community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso," *Malaria Journal*, vol. 13, no. 1, article 30, 2014.

[16] G. Snounou, S. Viriyakosol, Xin Ping Zhu et al., "High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 61, no. 2, pp. 315–320, 1993.

[17] N. Steenkeste, S. Incardona, S. Chy et al., "Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers," *Malaria Journal*, vol. 8, no. 1, article 86, 2009.

[18] W. Jarra and G. Snounou, "Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses," *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 8, pp. 3783–3787, 1998.

[19] L. Cnops, J. Jacobs, and M. Van Esbroeck, "Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 7, pp. 1101–1107, 2011.

[20] F. N. Baliraine, Y. A. Afrane, D. A. Amenya et al., "High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* Infections in a highland area of western Kenya: a cohort study," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 200, no. 1, pp. 66–74, 2009.

[21] M. P. Dal-Bianco, K. B. Köster, U. D. Kombila et al., "High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, no. 5, pp. 939–942, 2007.

[22] J. May, F. P. Mockenhaupt, O. G. Ademowo et al., "High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 61, no. 2, pp. 339–343, 1999.

[23] G. H. Stresman, A. Kamanga, P. Moono et al., "A method of active case detection to target reservoirs of asymptomatic malaria and gametocyte carriers in a rural area in Southern Province, Zambia," *Malaria Journal*, vol. 9, no. 1, article 265, 2010.

[24] B. Ogutu, A. B. Tiono, M. Makanga et al., "Treatment of asymptomatic carriers with artemether-lumefantrine: an opportunity to reduce the burden of malaria?" *Malaria Journal*, vol. 9, no. 1, article 30, 2010.

[25] S. E. Kern, A. B. Tiono, M. Makanga et al., "Community screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* with artemether-lumefantrine to reduce malaria disease burden: a modelling and simulation analysis," *Malaria Journal*, vol. 10, article 210, 2011.

Le précédent travail souligne l'importance du portage plasmodial asymptomatique en RDC. Il est clair que suite à cela, des interventions particulières pourraient être envisagées en complément de celles déjà mises en place (diagnostic et traitement correct des cas et utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à large durée d'action, essentiellement).

Outre ces infections "occultes" humaines, il a été démontré que certaines infections plasmodiales seraient inter-transmissibles entre certains primates. En effet, des espèces plasmodiales de petits singes (généralement des cercopithèques) se sont retrouvées naturellement chez l'humain en Asie et en Amérique latine. A notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été décrit en Afrique probablement parce que les méthodes conventionnelles de diagnostic qui sont utilisées (examen microscopique et TDR) ne peuvent discriminer les espèces simiennes des humaines. Nous avons alors imaginé, dans la publication suivante, un algorithme permettant de le faire en utilisant des techniques moléculaires.

II. 6. Etude 5: Investigation on possible transmission of monkeys' plasmodium to human in a populations living in the equatorial rainforest of the Democratic republic of Congo

Publié dans *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Décembre 2015

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 5 (2016) 1–4

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijppaw

Investigation on possible transmission of monkeys' Plasmodium to human in a populations living in the equatorial rainforest of the Democratic republic of Congo

Dieudonné Makaba Mvumbi [a, *], Thierry Lengu Bobanga [b], Solange Efundu Umesumbu [c], Billy Shako Kunyu [b], Jean-Marie Ntumba Kayembe [d], Nani-Tuma H. Situakibanza [b, d], Georges Lelo Mvumbi [a], Pierrette Melin [e], Patrick De Mol [e], Marie-Pierre Hayette [e]

[a] Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of Congo
[b] Department of Parasitology and Tropical Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of Congo
[c] National Malaria Control Program, Democratic Republic of Congo
[d] Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of Congo
[e] Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 June 2015
Received in revised form
19 November 2015
Accepted 26 November 2015

Keywords:
Monkey plasmodium
Democratic Republic of Congo
RT-PCR
Malaria

ABSTRACT

Plasmodiums are protozoa that may infect various hosts. Only five species are now recognized as naturally parasitizing humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi*. This fifth species, *P. knowlesi*, previously identified as naturally parasitizing the monkey *Macaca fascicularis*, has been microscopically confused for a long time with P. malariae or *P. falciparum* and it was not possible to correctly differentiate them until the advent of molecular biology. To date, natural human infections with *P. knowlesi* only occur in Southeast Asia and a similar phenomenon of natural transmission of simian plasmodium to humans has not been reported elsewhere. This study was conducted to investigate a possible transmission of African small monkey's plasmodium to humans in populations living near the rainforest of the Democratic Republic of Congo (DRC) where several species of non-human primates are living. Two successive real-time PCRs were identified in the literature and used in combination for purpose. Only *P. falciparum* was found in this study. However, studies with larger samples and with more advanced techniques should be conducted.
© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

The first report on the existence of simian *Plasmodium* was published in 1908 by Daniels (1908). It was believed that simian *Plasmodium* spp. infect only monkeys and that human *Plasmodium* spp. infect only humans. Eyles et al. (1960) showed that a *Plasmodium vivax*-like species, *Plasmodium cynomolgi*, could infect humans in the laboratory. Warren et al. (1970) reported the first case *Plasmodium knowlesi* in humans, which had been detected in 1965. This species has long been known as a natural parasite of the macaque (*Macaca fascicularis*) and prior to the advent of molecular techniques was misidentified in humans as *Plasmodium malariae* or *Plasmodium falciparum*, which it resembles morphologically (Singh et al., 2004; Lee et al., 2009). In a large study in Sarawak, Malaysia, Singh et al. (2004) detected a high prevalence (57.7%) in humans. Since then, natural infections with this species, confirmed using molecular techniques, have been reported from many other countries in South-East Asia (Jongwutiwes et al., 2004; Vythilingam et al., 2006; Zhu et al., 2006; Cox-Singh et al., 2008; Luchavez et al., 2008; Ng et al., 2008; Khim et al., 2011). Thus, *P. knowlesi* has been declared to be the fifth species of *Plasmodium* infecting humans (White, 2008). More recently, Ta et al. (2014) have reported the first case of naturally acquired human infection with *P. cynomolgi*, in a woman in Malaysia. An initial microscopic diagnosis of *P. malariae/P. knowlesi* was established, followed by a second microscopic re-examination and a nested PCR that identified

* Corresponding author.
E-mail addresses: didimvumbi@gmail.com (D.M. Mvumbi), tbobanga@gmail.com (T. Lengu Bobanga), solumes@yahoo.fr (S.E. Umesumbu), kunyushako@gmail.com (B.S. Kunyu), dr12jmkayembe@yahoo.com (J.-M. Ntumba Kayembe), hsitua@gmail.com (N.-T.H. Situakibanza), mvumbilelo@yahoo.fr (G.L. Mvumbi), pierrette.melin@ulg.ac.be (P. Melin), P.DeMol@ulg.ac.be (P. De Mol), mphayette@chu.ulg.ac.be (M.-P. Hayette).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.11.004
2213-2244/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

that species as *P. vivax*. However, a different PCR method and sequencing confirmed the infection as *P. cynomolgi.* These reports suggest that human infections by simian *Plasmodium* are probably under-reported because of misidentification. If *P. knowlesi* had been misdiagnosed for such a long time in Asia and if *P. cynomolgi* identification has been so difficult, it may be possible that in Africa, where many non-human primates live, natural transmission of simian *Plasmodium* spp. to humans has not been recognized. Indeed in Africa where malaria diagnosis is essentially microscopy-based, it is likely that some *Plasmodium* spp. in people have been misidentified.

Many studies have been reported that explore the presence of simian malaria parasites in human or human malaria parasites in other primates, but almost all of these studies were based on great apes, e.g., *Pan paniscus* (bonobo), *Pan troglodytes* (chimpanzee) or *Gorilla gorilla* (gorilla) (Contacos et al., 1970; Ollomo et al., 2009; Duval et al., 2010; Kaiser et al., 2010; Krief et al., 2010; Liu et al., 2010; Prugnolle et al., 2010). Very few studies included monkeys. For example, Prugnolle et al. (2011) analyzed blood samples from 338 monkeys of ten species and Pourrut et al. (2009) examined blood samples from 82 small monkeys (e.g., *Chlorocebus aethiops* and *Erythrocebus patas*) for *Plasmodium*. Many species of monkeys are present in the Democratic Republic of Congo (DRC) (Ladnyj et al., 1972; Colyn, 1994; Grubb et al., 2003) and some of these have been listed as hosts for *Plasmodium* species, especially *P. gonderi*, *Plasmodium petersi*, *Plasmodium georgesi* (Poirriez et al., 1993, 1995) and *Plasmodium* sp. DAJ- 2004 (Prugnolle et al., 2011). As *P. knowlesi* and *P. cynomolgi* naturally infect monkeys, and have been reported as able to also infect humans, the present study investigated the possible transmission of monkey *Plasmodium* to humans in a populations living in the equatorial rainforest of the DRC where several species of non-human primates are found.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Three villages of the Equatorial Province of the DRC, Bolenge (N: 00° 24′ 89″, E: 18° 22′ 29″), Bongonde (N: -0.15° 42′ 42″, E: 18° 22′ 35″) and Wendji-Secli (N: -00° 06′ 56″, E: 18° 22′ 35″), were selected based on geographical location near the equatorial rain forest. One hundred individuals without symptoms of malaria were randomly selected from each village without consideration of age or sex. People with fever were not selected. A drop of blood from each individual using a finger prick and absorbed on to filter paper Whatman 3 MM (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was made in duplicate for each individual. People in these villages practice daily forest activities such as hunting and gathering. Monkeys are captured for commerce and for food.

2.2. DNA extraction

Parasite DNA was extracted using QIAamp® DNA mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instruction for filter paper and in a final elution volume of 150 μL.

2.3. Plasmodium species identification

Two real-time PCR were identified in the literature and were successively applied to the DNA templates. The first one allows the detection of all *Plasmodium* spp. and the second one allows the detection of the four common *Plasmodium* species that infect humans in Africa (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* and *Plasmodium ovale*).

As the species specific Real-Time PCR was more sensitive than the pan primer one, we hypothesized that if the first Real-Time PCR was positive and the second negative, it would suggest that a *Plasmodium* species different from the four human species was detected. In that case, sequencing would be considered.

2.4. First RT-PCR

This RT-PCR includes a pair of primers (Plasmo 1 and Plasmo 2) and one probe (plasprobe), designed to detect genes of the small subunit 18S rRNA of *Plasmodium* species, that allow the detection of all *Plasmodium* spp. (Table 1) .The mix consists of 12.5 μl of 2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 200 nM of each primer, 50 nM of probe and water for a total volume of 25 μl including 5 μl of DNA. PCR conditions were as follows: an initial step at 50 °C for 2 min, 95C° for 10 min, and 45 cycles of 95 °C for 15 s followed by 1 min at 60 °C (Rougemont et al., 2004).

2.5. Second RT-PCR

Four species-specific forward primers, one universal reverse primer (Plasmo 2) and four species-specific probes were used in two simultaneous duplex reactions (Pfal + Pviv and Pmal + Pova) (Cnops et al., 2010). The probes and primers were designed to detect genes of the small subunit 18S rRNA of the four *Plasmodium* species. The mix consisted of 12.5 μl of 2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM of each primer and probes except for *P. vivax* at 100 nM in a final volume of 25 μl including 5 μl of DNA. The following conditions were used: 2 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C.

Both RT-PCR were run on a Stratagene Mxp 3000 Instrument (SABiosciences) and in the presence of positive controls (human *Plasmodium*) provided by the Parasitology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp and the Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Belgium.

To assess our methodology, *P. berghei* and *P. vinckei* cultures (provided by the Interfaculty Drug Research Center, University Hospital of Liege) have been used as non-human *Plasmodium* templates. Unfortunately, we were not able to test for the other monkey parasites *P. gonderi*, *P. georgesi*, *P. petersi or Plasmodium* sp. DAJ 2004.

3. Ethical considerations

This study has received the ethical approval of the Ministry of Public Health of the DRC and of the Institutional Committee of the Faculty of Medicine, University of Kinshasa.

4. Results and discussion

4.1. Assessment of the methodology

As template, *P. vinckei* and *P. berghei* were used together with the four human *Plasmodium* as positive controls for the two successive RT-PCRs. The first one detected all *Plasmodium* but the second only detected *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. vivax* (Table 2).

As we were not able at the time of this study to get *P. gonderi*, *P. petersi* or *P. georgesi* samples, we aligned the primers and the probes used for both real-time PCRs with their genome to explore if they could match. Only primers and probe of the first RT-PCR matched.

4.2. Parasite identification

Of the three hundred samples analyzed, 139 (46,3%) were

Table 1
Primers and probes sequences for the two RT-PCR.

RT-PCR	Forward primer	Reverse primer	Probes
plasmodiums sp	5′-GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA-3' (Plasmo1)	5′-TTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT-3' (Plasmo2)	5′-FAM-ACCGTCGTAA TCTTAACCAT AAACTATGCC GACTAG-TAMRA-3' (plasprobe)
Pfal	5′-CTAGGTGTTGGATG-3′		5′-FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-DQ-3' (Falprobe)
Pova	5′-CGACTAGGTTTTGGATG-3′		5′-VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT-DQ-3' (Ovaprobe)
Pviv	5′-GACTAGGCTTTGGATG-3′		5′-VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-DQ-3' (Vivprobe)
Pmal	5′-GACTAGGTGTTGGATG-3′		5′-FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-DQ-3' (Malprobe)

Table 2
Cycle threshold obtained for the 6 plasmodium species.

	P. falciparum	*P. malaria*	*P. ovale*	*P. vivax*	*P. vinckei*	*P. berghei*
1st RT-PCR	16.98	26.01	26.08	30.15	15.18	20.33
2nd RT-PCR	18.07	26.69	26.66	30.48	**No signal**	**No signal**

positive for both RT-PCRs. All 139 samples tested positive for *P. falciparum*. No other human *Plasmodium* species were detected. It is possible that the small sample size and the high prevalence of this species reported in the region (Ngimbi et al., 1980; Taylor et al., 2011; Mvumbi et al., 2013) could account for this. *P. malariae* and *P. ovale* are often found in association with *P. falciparum* and *P. vivax* is said to be very rare in that region because of the lack of the Duffy antigen in the population (Miller et al., 1976).

No monkey malaria parasites were found. However, the methodology used in this work is probably insufficient to confirm that there is no simian *Plasmodium* infecting humans in this area. Recent reports suggest that many simian *Plasmodium* species are phylogenetically close to those infecting humans. For example, Duval et al. (2009) described a *P. ovale-like Plasmodium* from chimpanzees in Cameroon, Kaiser et al. (2010) found a P. malariae-like infection in chimpanzees from Ivory Coast, and Krief et al. (2010) described new P. falciparum-like and P. vivax-like new parasites in DRC. These results indicate that some PCR assays cannot distinguish human *Plasmodium* species from those infecting simians. Further, the species-specific PCR primers described by Snounou et al. (1993) were unable to distinguish *P. knowlesi* from *P. malariae* (Cox-Singh et al., 2008) nor *P. vivax* from *P. cynomolgi* (Ta et al., 2014).

There is, therefore, the possibility that some of the *P. falciparum* we identified might be the P. falciparum-like parasite identified by Duval et al. (2010), by Krief et al. (2010) or by Liu et al. (2010). That is the major limitation of this study. The methodology used in the current study would allow us, however, to detect simian *Plasmodium* species that are phylogenetically distant from human species, e.g., *P. gonderi*, *P. petersi*, *P. georgesi* or *Plasmodium* sp. DAJ 2004.

5. Conclusion

In this study, we could not detect monkey *Plasmodium* species in a human population living near the rain forest of the Equatorial province of the DRC. We found only *P. falciparum*, which is the major species in this area. Though the methodology used here cannot discriminate simian P. falciparum-like from human *P. falciparum*, we can hypothesize that no other simian *Plasmodium* species were present in the individuals sampled. Studies on larger human populations using more advanced techniques (e.g., sequencing of mitochondrial genome of *Plasmodium* species or specific genes) would help to confirm this. To our knowledge, this work is the first to search for human infection with *Plasmodium* species from small apes in the DRC.

Acknowledgments

The authors thank the Molecular Biology Unit of the University Hospital of Liège, Belgium. This work was supported by the Coopération Universitaire pour le Développement (CUD)/Belgium.

References

Cnops, L., Jacobs, J., Van Esbroeck, M., 2010. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections. Clin. Microl. Biol. Infect. 17, 1101–1107.
Colyn, M., 1994. Données pondérales sur les primates Cercopithecidae d'Afrique Centrale (Bassin du Zaïre/Congo). Mammalia 58 (3), 483–488.
Contacos, P.G., Coatney, G.R., Orihel, T.C., Collins, W.E., Chin, W., Jeter, M.H., 1970. Transmission of Plasmodium schwetzi from the chimpanzee to man by mosquito bite. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 190–195.
Cox-Singh, J., Davis, T.M.E., Lee, K.S., Shamsul, S.S.G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J., Singh, B., 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin. Infect. Dis. 46, 165–171.
Daniels, C.W., 1908. Animal parasites in man and some of the lower animals in Malaya. Stud. Inst. Med. Res. FMS 3, 1–13.
Duval, L., Nerrienet, E., Rousset, D., Mba, S.A., Houze, S., Fourment, M., et al., 2009. Chimpanzee malaria parasites related to Plasmodium ovale in Africa. PLoS One 4, e5520.
Duval, L., Fourment, M., Nerrienet, E., Rousset, D., Sadeuh, S.A., Goodman, S.M., et al., 2010. African apes as a reservoir of Plasmodium falciparum and the origin and diversifi cation of Laverania subgenus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 10561–10566.
Eyles, D.E., Coatney, G.R., Getz, M.E., 1960. *Vivax*-type malaria parasite of macaques transmissible to man. Science 132, 1812–1813.
Grubb, P., Butynski, T.M., Oates, J.F., Bearder, S.K., Disotell, T.R., Groves, C.P., Struhsaker, T.T., 2003. Assessment of the diversity of African primates. Int. J. Primatol. 2003 (24), 1301–1357.
Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., Kanbara, H., 2004. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human. Thail. Emerg. Infect. Dis. 10, 2211–2213.
Kaiser, M., Lowa, A., Ulrich, M., Ellerbrok, H., Goffe, A.S., Blasse, A., et al., 2010. Wild chimpanzees infected with 5 Plasmodium species. Emerg. Infect. Dis. 16, 1956–1959.
Khim, N., Siv, S., Kim, S., Mueller, T., Fleischmann, E., Singh, B., et al., 2011. *Plasmodium knowlesi* infection in humans, Cambodia, 2007-2010. Emerg. Infect. Dis. 17, 1900–1902.
Krief, S., Escalante, A.A., Pacheco, M.A., Mugisha, L., André, C., Halbwax, M., et al., 2010. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of Plasmodium falciparum from bonobos. PLoS Pathog. 6, e1000765.
Ladnyj, D., Ziegler, P., Kima, E., 1972. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. Bull. Wild. Health Org. 46, 593–597.
Lee, K.S., Cox-Singh, J., Singh, B., 2009. Morphological features and differential counts of Plasmodium knowlesi parasites in naturally acquired human infections. Malar. J. 8, 73.
Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F., et al., 2010. Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. Nature 467, 420–425.
Luchavez, J., Espino, F.E., Curameng, P., Espina, R., Bell, D., Chiodini, P., Nolder, D., Sutherland, C., Lee, K.S., Singh, B., 2008. Human infections with *Plasmodium*

knowlesi, the Philippines. Emerg. Infect. Dis. 14, 811–813.
Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinniss, M.H., 1976. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks: the duffy-blood-group genotype, FyFy. N. Engl. J. Med. 295, 302.
Mvumbi, D.M., Boreux, R., Sacheli, R., Lelo, M., Lengu, B., Nani-Tuma, S., Melin, P., Ntumba, K., Lunganza, K., Demol, P., Hayette, M.P., 2013. Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Malar. J. 12, 459.
Ng, O.T., Ooi, E.E., Lee, C.C., Jarrod, L.P., Ng, L.C., Wong, P.S., Tu, T.M., Loh, J.P., Leo, Y.S., 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. Emerg. Infect. Dis. 14, 814–816.
Ngimbi, N.P., Beckers, A., Wery, M., 1980. Apercu de la situation épidémiologique du paludisme à Kinshasa (République du Zaire) en 1980. Ann. Soc. Belge. Méd. Trop. 62, 121–137.
Ollomo, B., Durand, P., Prugnolle, F., Douzery, E., Arnathau, C., Nkoghe, D., et al., 2009. A new malaria agent in African hominids. PLoS Pathog. 5, e1000446.
Poirriez, J., Baccam, D., Dei-Cas, E., Brogan, T., Landau, I., 1993. Description of Plasmodium petersi n. sp. and Plasmodium georgesi n. sp., parasites of a Cercocebus albigena monkey in the Central African Republic. Ann. Parasit. Hum. Comp. 68, 203–210.
Poirriez, J., Dei-Cas, E., Dujardin, L., 1995. Landau I.The blood-stages of Plasmodium georgesi, P. gonderi and P. petersi: course of untreated infection in their natural hosts and additional morphological distinctive features. Parasitology 111 (5), 547–554.
Pourrut, X., Robert, V., 2009. Absence d'infection plasmodiale chez les singes sauvages du Nord-Sénégal ? Bull. Soc. Pathol. Exot. 102 (1), 17–18.
Prugnolle, F., et al., 2010. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 1458–1463.
Prugnolle, F., Ollomo, B., Durand, P., Yalcindag, E., Arnathau, C., Elguero, E., Berry, A., Pourrut, X., Gonzalez, J.P., Nkoghe, D., Akiana, J., Verrier, D., Leroy, E., Ayala, F.J., Renaud, F., 2011. African monkeys are infected by Plasmodium falciparum nonhuman primate- specific strains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 11948–11953.
Rougemont, M., Van Saanen, M., Sahli, R., Hinrikson, H.P., Bille, J., Jaton, K., 2004. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J. Clin. Microbiol. 42, 5636–5643.
Singh, B., Lee, K.S., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 363, 1017–1024.
Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V., Thaithong, S., Brown, K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 61, 315–320.
Ta, T.H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A.I., Ismail, N., Rubio, J.M., 2014. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. Malar. J. 13 (1), 68.
Taylor, S.M., Messina, J.P., Hand, C.C., Juliano, J.J., Uwonga, J., Tshefu, A.K., Atua, B., Emch, M., Meshnick, S.R., 2011. Molecular malaria epidemiology: mapping and burden estimates for the Democratic Republic of the Congo, 2007. PLoS One 6 (1), e16420.
Vythilingam, I., Tan, C.H., Asmad, M., Chan, S.T., Lee, K.S., Singh, B., 2006. Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 1087–1088.
Warren, M.W., Cheong, W.H., Fredericks, H.K., Coatney, G.R., 1970. Cycles of jungle malaria in West Malaysia. Am. J. Trop. Med. 19, 383.
White, N.F., 2008. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin. Infect. Dis. 46, 172–173.
Zhu, H.M., Li, J., Zheng, H., 2006. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis. 24, 70–71.

Partie III :

De la chimiorésistance moléculaire du *Plasmodium falciparum* en RDC

III.1. Introduction

Le traitement médicamenteux à base des CTA constitue à ce jour un des piliers majeur de la lutte antipaludique. Plusieurs molécules de classes chimiques et de modes d'action différents ont été synthétisées à ce jour, ciblant les différents stades évolutifs du parasite. En RDC, plusieurs schémas thérapeutiques ont été appliqués au fil du temps. Ces modifications de politiques nationales de prise en charge sont dues au fait de la perte d'efficacité de ces molécules consécutives au développement de mécanismes de résistance par le parasite en cause. De la chloroquine utilisée en monothérapie en passant par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) l'ont est aujourd'hui en RDC, comme dans la majeure partie des zones impaludées, à l'usage des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Des cinq combinaisons recommandées par l'OMS, deux combinaisons ont été acceptées par le PNLP en RDC: l'artésunate-amodiaquine et l'artémether-luméfantrine. En outre, la quinine et l'artésunate (par voie parentérale) sont aussi utilisées en monothérapie pour les cas sévères et l'utilisation de la SP a été maintenue pour le traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte.

Certains faits néanmoins suscitent des inquiétudes quant à la survenue (ou à l'aggravation) de la résistance du *Plasmodium* à ces molécules:

- les monothérapies antipaludiques normalement proscrites, continuent à être commercialisées et consommées par la population en RDC;
- la SP, dont l'usage n'est réservé en principe qu'au TPI chez la femme enceinte, est utilisée par d'autres franges de la population;
- l'apparition de la résistance à l'artémisinine dans la zone frontalière entre le Cambodge et la Thaïlande, puis son expansion progressive à plusieurs pays de la sous-région du Grand Mékong (Asie du Sud-Est) présage de son expansion en Afrique, comme cela s'est produit précédemment pour d'autres molécules;

- la découverte assez récente des marqueurs moléculaires de résistance à l'amodiaquine dans deux pays voisins de la RDC (Angola et Tanzanie);
- le coût des soins médicaux étant relativement élevé et l'absence d'un système de santé bien organisé en RDC entraine les patients à s'automédiquer, généralement avec des médicaments et des posologies inadéquates.

Tout ceci appelle à une surveillance constante de l'efficacité de ces molécules car l'OMS a déterminé un seuil acceptable pour les molécules présentant de la résistance: au-delà de 10% de résistance, les autorités sanitaires doivent remplacer la molécule antipaludique par une autre ayant une prévalence de résistance inférieure à 10%. Mais avoir ces prévalences, suggère donc que des études soient réalisées, et idéalement, de manière répétitive. L'OMS recommande aux pays endémiques de réaliser des études de surveillance de la résistance au moins toutes les 2 années.

L'intérêt de ces études est donc double: suivre la tendance des souches résistantes déjà identifiées (diminution ou augmentation) et surveiller l'apparition de nouvelles souches résistantes dans des zones où elles étaient absentes afin de réadapter la politique de prise en charge rapidement dès la limite des 10% franchise.

La majorité des études testant l'efficacité des antipaludiques en RDC ont utilisé des tests in vivo (tests d'efficacité clinique au cours desquels des patients reçoivent une molécule et un suivi tant clinique que parasitologique est réalisé). La faiblesse de cette méthodologie est essentiellement liée au coût élevé de sa réalisation (environ 500.000$ pour conduire cette étude dans six différents sites géographiques selon les planifications du PNLP). En effet il faut mettre en place une logistique assez lourde (suivi des patients pendant 24 voire 48 jours, prélèvements sanguins répétitifs, personnel expérimenté, disponibilité des

antipaludiques, etc…) entrainant la difficulté d'étudier plusieurs sites concomitamment et donc plusieurs échantillons.

Bien que l'étude de cette résistance par l'évaluation des marqueurs moléculaires de résistance offre plusieurs avantages, très peu de travaux ont été conduits en RDC et encore moins dans plusieurs sites distincts.

Dans ce travail, nous avons voulu fournir une actualisation des données relatives à la résistance moléculaire de *P. falciparum* aux antipaludiques dans différentes aires géographiques de la RDC avec un accent particulier sur la résistance à l'artémisinine, molécule centrale de la prise en charge du paludisme dans le monde actuellement.

III.2. Objectifs

1. Explorer la possibilité d'étudier des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* en se basant sur de l'ADN extrait à partir des gouttes épaisses ;
2. Observer l'évolution de la chloroquinorésistance quelques années après l'introduction des ACT;
3. Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine et à l'amodiaquine à Kinshasa ;
4. Déterminer la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance dans les 3 faciès épidémiologiques de la RDC en rapport avec les CTA utilisés.

Afin d'atteindre ces différents objectifs, nous avons réalisé deux études sur des échantillons collectés en RDC. La première étude présente une certaine particularité du fait que l'ADN plasmodial utilisé pour analyser les marqueurs de résistance a été extrait à partir de gouttes épaisses; ce qui n'avait jamais été réalisé en RDC auparavant et certainement en Afrique. Cette première étude n'a concerné que Kinshasa et nous nous sommes limités, faute d'ADN suffisant comme expliqué plus haut, sur l'analyse d'un seul gène, le *pfcrt* en rapport avec la résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine. Il a fallu au préalable identifier des amorces

spécifiques entourant la région génique d'intérêt pour l'amplification puis nous avons séquencé et comparé nos séquences avec la séquence d'une souche appelée de référence appelée "3D7" , chloroquinosensible.

La seconde étude par contre a porté sur six différentes aires géographiques disséminées à travers la RDC. Nous avons veillé à ce que tous les faciès épidémiologiques soient représentés. Afin de pouvoir analyser plusieurs marqueurs moléculaires, nous avons préconisé d'effectuer les prélèvements sanguins sur papiers-filtres. Cela nous a permis d'amplifier deux régions d'intérêts sur les gènes *pfcrt* et *K13* et d'explorer le nombre de copies du gène *pfmdr1*.

Les résultats de ces deux travaux sont repris dans les publications ci-dessous.

III.4. Etude 6: Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo

Publié dans Malaria Journal, Décembre 2013

Mvumbi et al. Malaria Journal 2013, 12:459
http://www.malariajournal.com/content/12/1/459

MALARIA JOURNAL

RESEARCH Open Access

Assessment of *pfcrt* 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo

Dieudonné Makaba Mvumbi[1*], Raphael Boreux[2], Rosalie Sacheli[2], Mvumbi Lelo[1], Bobanga Lengu[3], Situakibanza Nani-Tuma[3], Pierrette Melin[2], Kayembe Ntumba[4], Kalala Lunganza[1], Patrick DeMol[2] and Marie-Pierre Hayette[2]

Abstract

Background: In 2001, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) as the first-line treatment of uncomplicated malaria cases, as monotherapies had become ineffective in many parts of the world. As a result, the Democratic Republic of Congo (DRC) withdrew chloroquine (CQ) from its malaria treatment policy in 2002 and an artesunate (AS)-amodiaquine (AQ) combination became the ACT of choice in DRC in 2005. AQ-resistance (AQR) has been reported in several parts of the world and mutations in codons 72-76 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter (*pfcrt*) gene have been strongly correlated with resistance, especially mutations encoding the SVMNT haplotype. This haplotype was first identified in Southeast Asia and South America but was recently reported in two African countries neighbouring DRC. These facts raised two questions: the first about the evolution of CQ resistance (CQR) in DRC and the second about the presence of the SVMNT haplotype, which would compromise the use of AQ as a partner drug for ACT.

Methods: A total of 213 thick blood films were randomly collected in 2010 from a paediatric clinic in Kinshasa, DRC. Microscopy controls and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed for *Plasmodium* species identification. Haplotypes of the *pfcrt* gene were determined by sequencing.

Results: The K76T mutation was detected in 145 out of 198 *P. falciparum*-positive samples (73.2%). In these 145 resistant strains, only the CVIET haplotype was detected.

Conclusions: This study is the first to assess the molecular markers of resistance to CQ and AQ after the introduction of ACT in DRC. The results suggest first that CQR is decreasing, as wild-type *pfcrt* haplotypes were found in only 26.8% of the samples and secondly that the SVMNT haplotype is not yet present in Kinshasa, suggesting that AQ remains valid as a partner drug for ACT in this region.

Keywords: Malaria, *pfcrt*, Drug resistance, RT-PCR, Sequencing, DR Congo

* Correspondence: didimvumbi@gmail.com
[1]Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, BP 190 KIN XI, Kinshasa, DR Congo
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Mvumbi 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. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

In 2001, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) as the first-line treatment of uncomplicated malaria cases because monotherapies had become ineffective in many parts of the world due to the spread of *Plasmodium falciparum* strains resistant to almost all anti-malarial drugs in use [1].

Resistance to chloroquine (CQ), the drug that had been widely used for decades for malaria treatment [2], has been well characterized and it is now established that a mutation (K76T) occurring in the *P. falciparum* chloroquine-resistance transporter (*pfcrt*) gene is the key element [3-5]. Nevertheless many other mutations have been described in this gene [6].

Childs and colleagues were the first to show *in vitro* cross-resistance between amodiaquine (AQ) or its active metabolite and CQ [7]. Because of their pharmacological similarity, CQ and AQ were supposed to have the same molecular mechanism of resistance. Furthermore, Ochong et al., by analysing samples from a clinical trial held in southern Sudan, demonstrated a link between the K76T mutation and *in vivo* AQ resistance [8]. A few years later, other studies performed on the *pfcrt* gene revealed that some haplotypes defined by the aminoacids sequence at positions 72-76 of the CRT protein were related to a particular resistance profile and also to a specific geographical distribution. Sa et al. analysed reference strains and provided the first *in vitro* evidence that one of these haplotypes, the SVMNT (Ser-Val-Met-Asn-Thr), was strongly correlated with resistance to desethylamodiaquine (DEAQ), the active metabolite of AQ [9]. One year later, *in vivo* evidence of this link has been given by Beshir et al. who found that the presence of the SVMNT haplotype was sufficient to confer AQ resistance [10].

This haplotype was initially discovered in Asia and in South America [11,12], but it has recently been found in two African countries: first in Tanzania in 2006 [13], then in 2010 in Angola [14]. Both countries border the Democratic Republic of Congo (DRC), where CQ, after being widely used, was officially abandoned in 2002 to be replaced first by sulphadoxine-pyrimethamine (SP) and then by an artesunate-amodiaquine (AS-AQ) combination in 2005 [15].

This raised questions about the presence of the SVMNT haplotype in the DRC, which would jeopardize the use of AQ as a partner drug for ACT. These questions were addressed in this study.

Methods

Sample collection

A total of 213 thin and thick blood films (TBF) were randomly selected in April 2010 from the laboratory archives of the St Marc Paediatric Clinic of Masina (Kinshasa). All the smears were positive using microscopic recordings as selection criteria. The blood samples had been collected between January and March 2010 from children under five years who were suspected of malaria.

Malaria diagnosis

All blood smears underwent microscopic control performed by two experienced microscopists and the results were confirmed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

DNA extraction

The whole TBF was used for DNA extraction, leaving the thin smear for microscopic reading. Each TBF was first immersed in xylene for 10 s to avoid contamination between samples and to dissolve any residual oil from previous microscopic examinations. Then it was scratched out with a sterile scalpel as described previously by Cnops et al. [16]. The scraped material was transferred into a 1.5 ml sterile Eppendorf tube containing 100 μl of PBS and then used as a template for a semi-automated extraction using the Maxwell® 16 Cell LEV DNA purification Kit (Promega, USA). A DNA internal extraction and inhibition control was used to follow the extraction procedure (DIAcontrolDNA®, Diagenode, Belgium). DNA was stored at -20°C before processing.

Real-time PCR

The RT-PCR method for *Plasmodium* sp. identification was used as previously described [17]. Briefly, a four-primer PCR was used in two duplex reactions including a couple of forward primers (*Pfal* + *Pviv* and *Pmal* + *Pova*) with a universal reverse primer (plasmo2). The probes and primers were designed to detect genes of the small subunit 18S rRNA of *Plasmodium* species (Table 1). The mix consisted of: 12.5 μl of 2X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 200 nM of all primers and probes except *P. vivax* at 100 nM (primers and probe), 2.5 μl of Internal Control primers and probes and the rest of water to make a total volume of 25 μl including 5 μl of DNA. PCR tests were run on a 7500 Fast Instrument (Applied Biosystems) and in the presence of positive controls (provided by the Parasitology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp and the Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège). PCR conditions were as follows: 2 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C.

Pfcrt genotyping

The procedure previously described by Ménard et al. [18] was modified by adding an M13 fragment on the 5′ ends of the *pfcrt* primers (Table 1) to amplify a 154 bp fragment that included the *pfcrt* codons in positions 72-76 of all of the *P. falciparum*-positive samples. PCR tests

Table 1 Primer and probe sequences

RT-PCR	Forward primer (plasmo1)	Reverse primer (plasmo2)	Probes
Pfal	5′-CTAGGTGTTGGATG-3′	5′-TTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT-3′	5′-FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCT CGAAAGATGACT-DQ-3′
Pova	5′-CGACTAGGTTTTGGATG-3′		5′-VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT-DQ-3′
Pviv	5′-GACTAGGCTTTGGATG-3′		5′-VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCG AAGAGAAAATTCT-DQ-3′
Pmal	5′-GACTAGGTGTTGGATG-3′		5′-FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-DQ-3′
PCR/genotyping	**Forward primer**	**Reverse primer**	
Pfcrt	5′-GTTCTTGTCTTGGTAAATGTGCTCA-3′	5′-CAATT TTGTTTAAAGTTCTTTTAGCAA-3′	

Legend: Pfal: *P. falciparum*; Pova: *P.ovale*; Pviv: *P. vivax*; Pmal: *P. malariae;* DQ: Darkquencher.

were run on a Hybaid PX2 (ThermoFischer Scientific, USA) under the following conditions: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 20 s at 95°C and 45 s at 60°C. Amplification was controlled on a microchip electrophoresis system using the MCE®-202 MultiNA (Shimadzu). Amplicons were purified on Sciclone G3 Automated Liquid Handling Workstation (Perkin Elmer, USA) using AgencourtCleanSEQ® kit (Agencourt Bioscience, USA).

Sequencing was performed on a 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems, USA).

Sequences were aligned using the GeneStudioTM® Professional software and were compared with the reference sequence of the CRT protein [GenBank: CAD50842.1] using the online BLASTx tool.

Ethical considerations

This study has received the ethical approbation of the Ministry of Public Health of the DRC and of the Institutional Committee of the Faculty of Medicine, University of Kinshasa.

Results

Malaria diagnosis confirmation

RT-PCR lead to the detection of 202/213 (93.4%) positive samples for *P. falciparum* including three mixed infections (*P. falciparum* + *Plasmodium malariae*).

Pfcrt haplotypes

Pfcrt genotyping was successfully performed for 198 *P. falciparum* samples from the 202 positive samples detected by RT-PCR. Among them, 145 K76T mutants (73.2%) were detected and they were all harbouring the CVIET haplotype. The wild strains had the CVMNK haplotype. No other haplotypes were detected.

Discussion

Nearly ten years after the withdrawal of CQ in the first-line treatment of malaria in the DRC, CQR strains remain above the warning threshold established by WHO. However the prevalence of pfcrt 76 T mutants continues to decline as shown in previous studies performed in DR Congo where a slow reversion in sensitivity has been recorded. Indeed, the percentage of Pf resistant strains went from 100% in 2000 [19], to 93% in 2002 [20], 83.8% in 2008 [21] and 73.2% in the present study. Finally, over the last ten years, the prevalence of resistant strains has decreased by 26.8%. In other countries however, the decrease was much more significant like in Malawi where CQR fell from 85% to 13% in 8 years [22] after replacing CQ by SP or in Gabon with a drop of 55% (100% to 45%) in 6 years [23]. This fact could be explained by the large area covered by DRC that is more difficult to control, and by the relatively high cost of ACT compared to former monotherapies, resulting in a slower anti-malarial policy shift. Until 2007, CQ was still the most widely used anti-malarial drug in the DRC [24] although it was officially removed since 2002 and firstly replaced by SP. Aside from the efficiency with which new drug policies were implemented, malaria transmission intensity in the region and the use of many other anti-malarial drugs in addition to the national policy have been suggested to explain the difference in trend [25].

The CVIET haplotype was the only resistant haplotype identified in the present study. Indeed, it is the most prevalent haplotype among the five discovered to date in Africa and it seems that it has migrated from Southeast Asia to Africa via India [26,27]. Some studies have described this haplotype as a necessary but insufficient condition to confer AQ resistance [28,29]. Beshir et al. suggested that if the CVIET haplotype is highly prevalent, AQ can still be effective and further mutations on the *P. falciparum* multidrug resistance gene (*pfmdr1*) are required for the development of clinically significant AQ resistance [10].

The only existing results on 72-76 *pfcrt* haplotypes that are available for the DRC refer to samples collected in 2000. The study identified 100% of resistant strains and these were distributed as follows: 14/27 (51.8%) SVIET, 12/27 (44.4%) CVIET and 1/27 (3.7%) of CVMNT [18]. Studies on a larger scale should be more representative of the high prevalence of the SVIET haplotype, which

appears to be rare elsewhere in the world. In fact, it was found before only once, in a study performed in Papua New Guinea [30].

Our results showed that the SVMNT haplotype is not yet present in Kinshasa suggesting that AQ remains valid as a partner drug for ACT. However, continuous monitoring is necessary because, initially absent from Africa, the SVMNT haplotype suddenly appeared in Tanzania in 2004, where it was not present the year before [13]. This fact shows how the emergence of a new haplotype can be spontaneous. This haplotype has been also found recently in Angola by Gama et al. who supposed that this haplotype may have been imported from Brazil [14]. Frosch et al. showed that Angola and Tanzania were among African countries where AQ was more extensively used than in other countries during the last decade [31]. This fact could have contributed to the selection of SVMNT resistant strains, as suggested by Sa and by others, who stipulated that AQ had a prominent role in the selection of parasites carrying the SVMNT haplotype [10,13,32,33]. In fact, SVMNT haplotype is predominant in countries where AQ was early and widely used [32].

Malaria is a disease of great geographical diversity and, as DRC is a very large country, the results of this study concern only the region of Kinshasa and further studies are needed.

Conclusion

This study confirms the slow reverse in sensitivity to CQ in Kinshasa. This is the first to assess resistance to AQ through *pfcrt* haplotypes after CQ withdrawal, especially based on TBFs. AQ remains effective as a partner molecule for ACT in Kinshasa but monitoring of *P. falciparum* genomic resistance is mandatory.

Abbreviations

ACT: Artemisinin-based combination therapy; AQ: Amodiaquine; AS: Artesunate; CQ: Chloroquine; DNA: Deoxyribonucleic acid; DRC: Democratic Republic of Congo; RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; SP: Sulphadoxine-pyrimethamine; TBF: Thick blood film; WHO: World health organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest

Authors' contributions

MMD collected samples, carried out the DNA extraction, performed RT-PCR analysis and drafted the manuscript. RB and RS supervised genotyping analysis. ML, KL and SN conceived and designed the study protocol. BL participated in collecting samples. PM provided materials. MPH, KN and PDM supervised the study. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Molecular Biology Unit of the University Hospital of Liège, Belgium.
This work was supported by the Coopération Universitaire pour le Développement (CUD)/Belgium.

Author details

[1]Biochemistry and Molecular Biology Unit, Department of Basic Sciences, School of Medicine, University of Kinshasa, BP 190 KIN XI, Kinshasa, DR Congo. [2]Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium. [3]Department of Tropical Medicine and Infectious Disease, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo. [4]Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, DR Congo.

Received: 16 September 2013 Accepted: 4 December 2013
Published: 20 December 2013

References

1. World Health Organization: *Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO technical consultation.* Geneva: WHO; 2001.
2. Wellems TE: ***Plasmodium*** **chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug.** *Science* 2002, **298:**124–126.
3. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE: **Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance.** *Mol Cell* 2000, **6:**861–871.
4. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA: **Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations.** *Science* 2002, **298:**210–213.
5. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su X-Z, Noruma T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV: **A molecular marker for chloroquine resistant *falciparum* malaria.** *N Engl J Med* 2001, **344:**257–263.
6. Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q: ***pfcrt*** **Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47:**3500–3505.
7. Childs GE, Boudreau EF, Milhous WK, Wimonwattratee T, Pooyindee N, Pang L, Davidson DE Jr: **A comparison of the *in vitro* activities of amodiaquine and desethylamodiaquine against isolates of *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 1989, **40:**7–11.
8. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A: **Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69:**184–187.
9. Sa JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, Wellems TE: **Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106:**18883–18889.
10. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, Durrani N, Leslie T, Rowland M, Hallett RL: **Amodiaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Afghanistan is associated with the pfcrt SVMNT allele at codons 72 to 76.** *Antimicrob Agents Hemother* 2010, **54:**3714–3716.
11. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ: **Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*.** *Nature* 2002, **418:**320–323.
12. Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LMB, Jacobs-Lorena V, McNamara DT, Bockarie MJ, Kazura JW, Kyle DE, Fidock DA, Zimmerman PA: **Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with *Pfcrt* polymorphism in Papua New Guinea and South America.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98:**12689–12694.
13. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, Vestergaard LS, Staalsoe T, Jensen AT, Enevold A, Ronn AM, Khalil IF, Warhurst DC, Lemnge MM, Theander TG, Bygbjerg IC: **Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania.** *J Infect Dis* 2006, **193:**1738–1741.
14. Gama BE, de Carvalho GA P, LutucutaKosi FJ, de Oliveira NK A, Fortes F, Rosenthal PJ, Daniel Ribeiro CT, da Cruz MD F: ***Plasmodium falciparum*** **isolates from Angola show the SVMNT haplotype in the pfcrt gene.** *Malar J* 2010, **9:**174.
15. Kazadi WM, Vong S, Makina BN, Mantshumba JC, Kabuya W, Kebela B, Ngimbi NP: **Assessing the efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Democratic Republic of Congo.** *Trop Med Int Health* 2003, **8:**868–875.

16. Cnops L, Van Esbroeck M, Bottieau E, Jacobs J: **Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR.** *Malar J* 2010, **9**:370.
17. Cnops L, Jacobs J, Van Esbroeck M: **Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections.** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**:1101–1107.
18. Menard S, Morlais I, Tahar R, Sayang C, IssamouMayengue P, Iriart X, Benoit-Vical F, Lemen B, Magnaval J-F, Awono-Ambene P, Basco LK, Berry A: **Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* drug susceptibility at the time of the introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaoundé, Cameroon: implications for the future.** *Malar J* 2012, **11**:113.
19. Severini C, Menegon M, Sannella AR, Paglia MG, Narciso P, Matteelli A, Gulletta M, Caramello P, Canta F, Xayavong MV, Moura IN, Pieniazek NJ, Taramelli D, Majori G: **Prevalence of pfcrt point mutations and level of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Africa.** *Infect Genet Evol* 2006, **6**:262–268.
20. Wilson PE, Kazadi W, Kamwendo DD, Mwapasa V, Purfield A, Meshnick SR: **Prevalence of pfcrt mutations in Congolese and Malawian *Plasmodium falciparum* isolates as determined by a new Taqman assay.** *Acta Trop* 2005, **93**:97–106.
21. Mobula L, Lilley B, Tshefu AK, Rosenthal PJ: **Resistance-mediating Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**:555–558.
22. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimdé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV: **Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine in Malawi.** *J Infect Dis* 2003, **187**:1870–1875.
23. Schwenke A, Brandts C, Philipps J, Winkler S, Wernsdorfer WH, Kremsner PG: **Declining chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon from 1992 to 1998.** *Wien Klin Wochenschr* 2001, **113**:63–64.
24. MeasureDHS, ICF Macro: [http://www.measuredhs.com] EDS RDC 2007.
25. Gharbi M, Flegg JA, Hubert V, Kendjo E, Metcalf JE, Bertaux L, Guérin PJ, Le Bras J, Members of the French National Reference Centre for Imported Malaria Study: **Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of *Plasmodium falciparum* in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000-2011.** *Malar J* 2013, **12**:35.
26. Awasthi G, Prasad GBKS, Das A: **Population genetic analyses of *Plasmodium falciparum* chloroquine receptor transporter gene haplotypes reveal the evolutionary history of chloroquine-resistant malaria in India.** *Int J Parasitol* 2011, **41**:705–709.
27. Anderson TJ, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F: **Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcrt*) and multidrug resistance gene (*pfmdr*) associated with antimalarial drug resistance?** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:2180–2188.
28. Holmgren GJ, Hamrin J, Svard J, Mårtensson A, Gil JP, Bjorkman A: **Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa.** *Infect Genet Evol* 2007, **7**:562–569.
29. Nsobya SL, Dokomajilar C, Joloba M, Dorsey G, Rosenthal PJ: **Resistance-mediating *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr1 alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:3023–3025.
30. Nagesha SH, Casey GJ, Rieckmann KH, Fryauff DJ, Laksana BS, Reeder JC, Maguire JD, Baird JK: **New haplotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcrt*) gene among chloroquine-resistant parasite isolates.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:398–402.
31. Frosch AEP, Venkatesan M, Laufer MK: **Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data.** *Malar J* 2011, **10**:11.
32. Sa JM, Twu O: **Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type.** *Malar J* 2010, **9**:374.
33. Folarin OA, Bustamante C, Gbotosho GO, Sowunmi A, Zalis MG, Oduola AMJ, Happi CT: ***In vitro* amodiaquine resistance and its association with mutations in pfcrt and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria.** *Acta Trop* 2011, **120**:224–230.

doi:10.1186/1475-2875-12-459
Cite this article as: Mvumbi *et al.*: Assessment of *pfcrt* 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal* 2013 **12**:459.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Cette étude nous a permis d'évaluer la résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine à Kinshasa, sur base de gouttes épaisses conservées pendant quelques années. Grâce à cette méthode, il serait donc possible d'étudier rétrospectivement l'apparition d'un marqueur moléculaire à une certaine époque et déterminer, approximativement le moment de sa survenue dans une contrée quelconque et d'observer ainsi son évolution dans le temps.

Comme dans les autres pays où la chloroquine a été officiellement retirée, la prévalence des mutants diminue au profit des souches sensibles. Mais il semblerait qu'en RDC cette réversibilité se fait à un rythme lent, certainement en regard des dimensions énormes du pays et donc de la difficulté de mise à l'échelle des interventions conduites (implantation progressive des CTA dans l'ensemble du pays) mais aussi à la persistance de l'utilisation de cette molécule dans presque tous les recoins du pays.

III.5. Etude 7: Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo

Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo

Mvumbi DM[1,2]*; Bobanga TL[3,] Kayembe JMN[4], Mvumbi GL[1], Situakibanza HNT[3,4], Benoît-Vical F[5], Melin P[2], De Mol P[2] , Hayette MP[2]

Background

In the Democratic Republic of Congo (DRC), where 97% of the population is annually bitten by mosquitoes, malaria is still a major public health problem. Interventions conducted the last ten years lead to reduce malaria related morbidity-mortality [OMS], but further efforts have to be done to reach the target fixed by the WHO in its Global technical strategy for malaria 2016-2030 : to reduce malaria mortality and incidence by 90% in 2030 [2].

Efforts must be strengthened in many topics, such as surveillance and containment of *P. falciparum* resistant strains. Resistance, that could be defined as the ability of a parasite strain to survive or multiply in the presence of drug concentrations that normally destroy parasites of the same species or prevent their multiplication [3], is an old phenomenon. All drugs submitted to the malaria parasite became, some years after their introduction, obsolete [4]. In response to it, WHO experts have recommended to use combination therapies including an artemisinin component instead of using monotherapies [5]. Presently, virtually all endemic countries have officially adopted artemisinin-based combination therapies (ACT), among the available list, as first-line treatment for non-severe malaria.

In DRC, two artemisinin-based combination therapies (ACT) have been accepted by the National Malaria Control Program (NMCP): Artesunate-Amodiaquine in 2005 followed by Artemether-Luméfantrine in 2010. Both combinations are available in the country.

Resistance to previous antimalarials has lead to an increase of malaria mortality from 1980 to 2004 [6], increase of the global cost for disease control [7, 8], increase of transmission [9] and it is clear that the spread of artemisinin resistance to Africa would seriously threaten malaria control [10]. This resistance has been clearly established in South-East Asia but currently, no report of artemisinin resistance has been described in Africa [11].

Monitoring parasite resistance to antimalarial drugs is mandatory in malaria control strategies. Molecular markers are a good alternative to *in vivo* treatment trials or *in vitro* drug susceptibility testing to detect drug-resistant strains as they allow analyzing large sample and assessing resistance to many antimalarial drugs simultaneously [12]. Unfortunately, molecular studies require expensive infrastructures and reagents and also qualified persons that are not always available in sub-Saharan Africa. This can explain the small number of studies conducted in DRC [13].

Actually, some molecular markers associated with malaria resistance have been clearly described. The K76T mutation occurring on the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter (*Pfcrt*) gene is the key element of chloroquine resistance [14] and the SVMNT haplotype found in the same gene has been clearly linked to amodiaquine resistance [15]. Moreover, Ariey et al. provided the link between mutations in the propeller region of the *Kelch* 13 gene (*K13*, PF3D7_1343700) and artemisinin

resistance [16]. Mutations on the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (Pfmdr1) gene and increase of its copy number have been related to resistance to many monotherapies [17-20] but also linked to ACT introduction [21, 22].

In previous studies, we have detected a high prevalence of *pfcrt* mutants in Kinshasa [23] so in the present work we have extended the analysis to five other geographic areas in DRC. We investigated resistance to ACT currently in use in DRC by surveying molecular polymorphisms in three genes: *Pfcrt*, *Pfmdr1* and *K13* to explore possible emergence of amodiaquine, artemisinine or luméfantrine resistance in DRC.

Methods

Study sites and participants

We conducted this study in six areas (Figure 1) with different dynamics of transmission: Bolenge, Luzizila and Mweka in the equatorial facies; Punia and Kapolowe in the tropical facies and Beni in the mountain facies. In each site, one hundred individual has been randomly selected in a household survey (except for Punia where only eighty individuals could be selected), after being given an informed consent. This survey was conducted between March and November 2014.

Blood collection and parasite identification

For each individual, blood samples were collected from finger prick and DNA was extracted by using the QiaAmp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described [23].

One real-time PCR consisting in two duplex reactions (identifying *P. falciparum* + *P. ovale* and *P. malariae* + *P. vivax*) was run to detect *Plasmodium* species [24] on a

Lightcycler 480 instruments (Roche®) in the Clinical microbiology Unit of the University Hospital of Liege, Belgium. *P. falciparum* positive samples were stored at −20°C for further molecular analysis.

Assessing Pfmdr1 copy number

A relative quantification multiplex real-time PCR was run by using a couple of primers plus a FAM-labelled probe for Pfmdr1 detection and another couple of primers with a VIC-labeled probe for β-tubullin detection [25]. Assays were run on a Lightcycler 480 instrument (Roche®) in the presence of one single copy control reference strain3D7. The results were analyzed by the comparative ΔΔCt method. Parasites were considered to have an amplified pfmdr1 gene if copy number was > 1.5 [26].

Assessing Pfcrt 72-76 haplotypes

A conventional PCR was run to amplify an approximately 152 pb fragment on the *Pfcrt* gene containing the region of interest followed by sequencing of amplicons, as described in a previous work [23]. Both 3D7 and K1 reference strains, respectively sensitive and resistant to chloroquine, were used as control during the assays.

Assessing polymorphisms on the K13 propeller gene

Another conventional PCR was run by using primers recently described by Ariey et al. [27] to amplify a fragment including positions where mutations related to artemisinin resistance were found. All PCR assays were run in the presence of the F32-ART reference strain provided by the Parasitology and Mycology Unit of the University Hospital of Toulouse, France. All amplicons were purified on a Sciclone G3 Automated Liquid Handling Workstation (Perkin Elmer, USA) using AgencourtCleanSEQ® kit (Agencourt Bioscience, USA) and then sequenced jointly in

the GIGA centre of University of Liege, Belgium and in the Molecular biology platform of the University Hospital of Liege, Belgium using a 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems, USA).

The *K13*-propeller SNPs were analyzed by comparing with the reference 3D7 strain (PF3D7_1343700) using Sequencher® Software Ver. 5.4.5 (Gene Codes corporation, Michigan, USA) and the online BLASTx tool (National Center for Biotechnology Information, USA).

Results

Out of the 580 samples collected over the six geographic sites, 280 (48.2%) were PCR-positive to *P. falciparum*, among which 6 (2.14%) were mixed infections (combined only with *P. malariae*). Distribution of these prevalence by area and by age group have been described in a previous published study [27].

Pfmdr1copy number

Pfmdr1 analysis was successful for all *P. falciparum* positive samples. Only three samples (1.07%), all found in Butembo (Nord-Kivu province) have a copy number amplification beyond 1.5. Figure 1 shows the copy number estimation of the Pfmdr1 for each site.

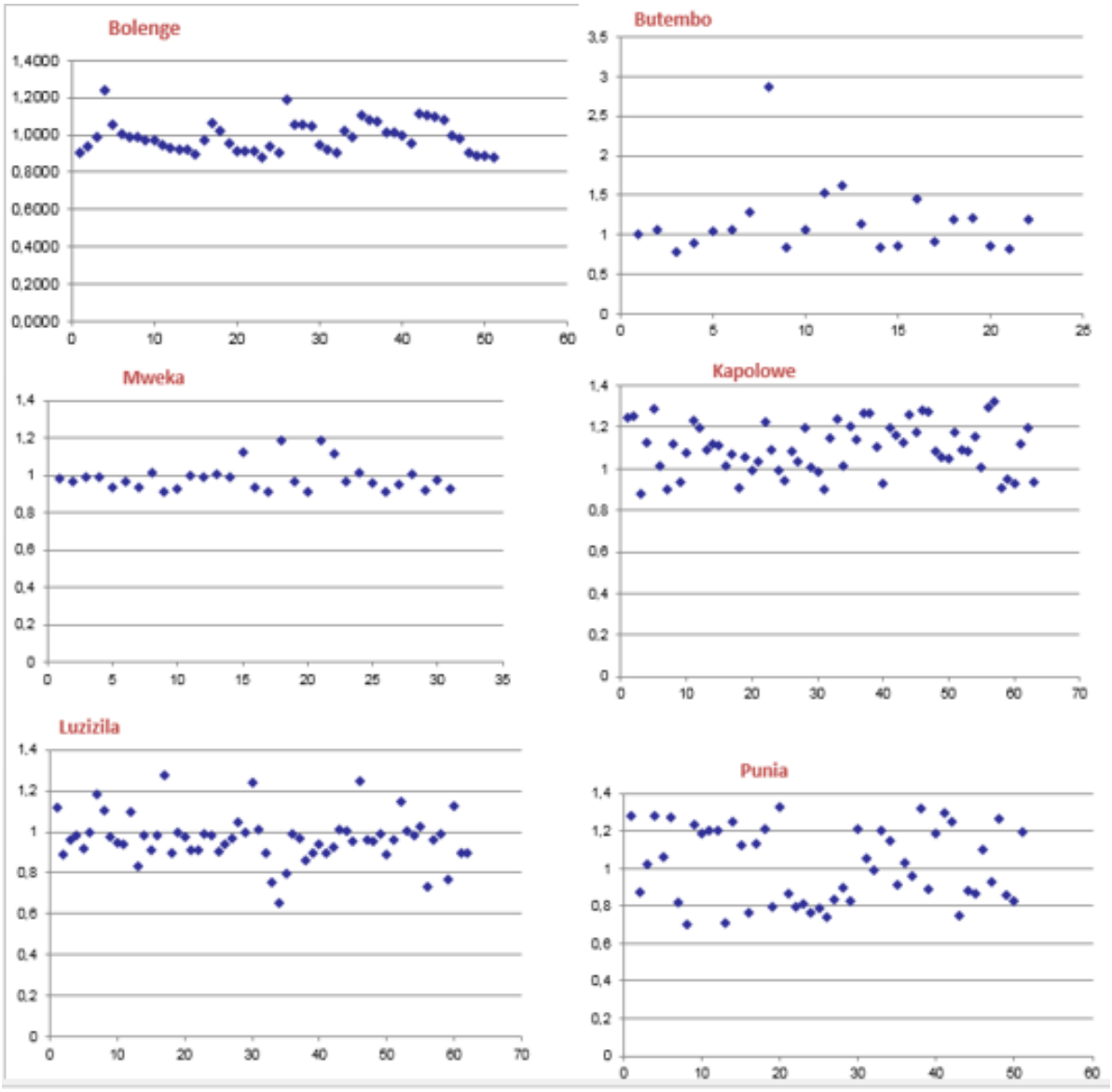


Figure 1. *Pfmdr1* copy number estimation in six geographic sites in DRC

Pfcrt haplotype

One hundred and eighty-four samples (65,7%) harbored the 76T mutation among which two had the relatively rare CVMNT haplotype (in Mweka and Kapolowe) and the rest got the CVIET one.

K13 propeller polymorphism

On the 280 samples analyzed, sequencing was correctly done for 261 samples. We identified 9 samples (3.4%) with mutations in the propeller domain of the *K13* among which 4 mutations that have not yet been described in Asia or Africa (F495L, Q476K, N523T and E509D) as represented in Figure 1. All of these mutations occurred after the position 440.

All results obtained for these molecular markers are presented in Table 1.

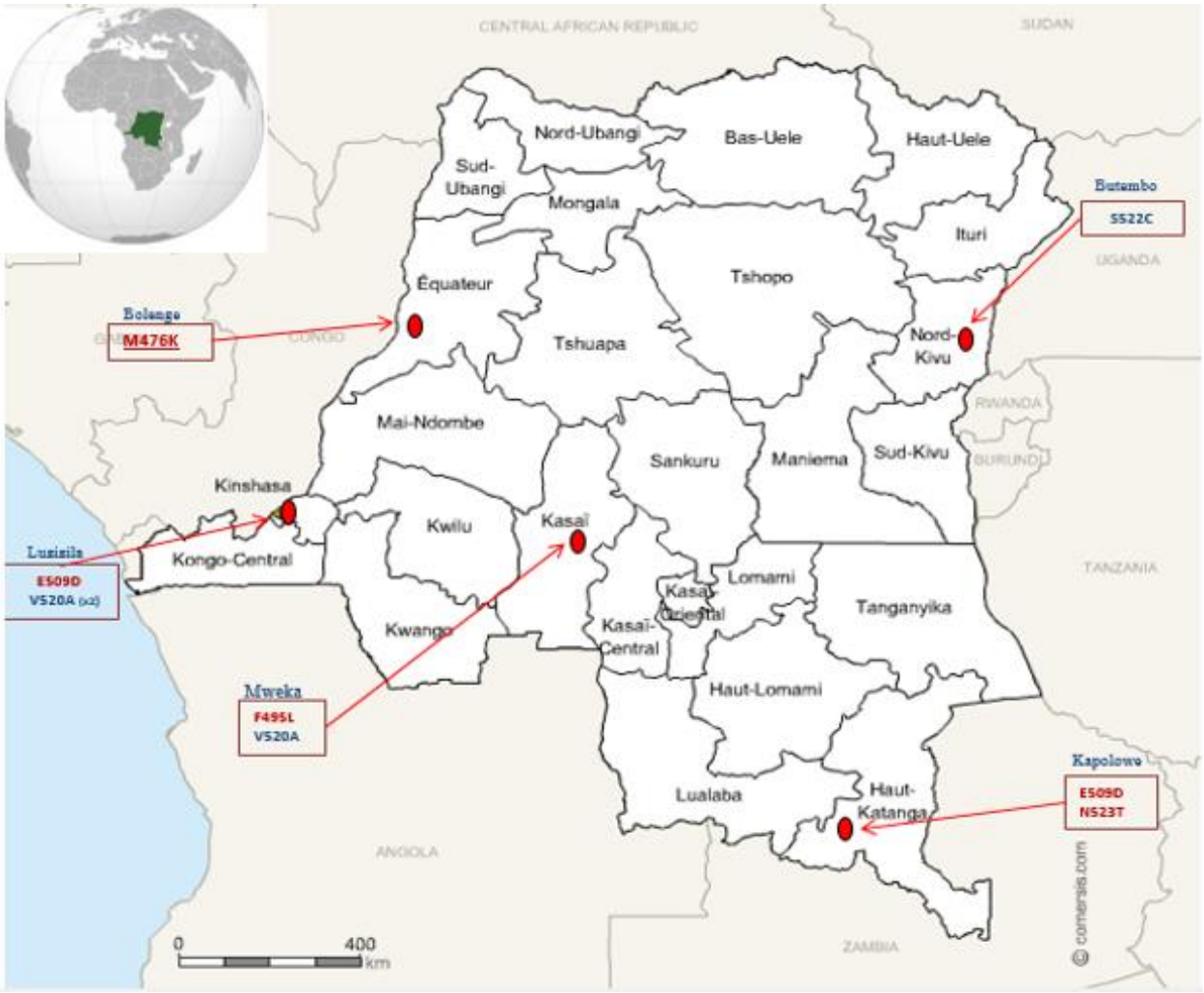


Figure 2. Distribution of mutations found in the k13 gene across DRC

Table 1. Analysis of molecular markers related to Pf resistance in DRC.

		Bolenge		Mweka		Kapolowe		Luzizila		Butembo		Punia	
Mol. marker	Status	N	N (%)	N	N (%)	N	N (%)	N	N (%)	N	N (%)	N	N (%)
pfcrt		51		31		63		62		22		51	
	W		15 (29.4)		10 (32.3)		22 (34.9)		24 (38.7)		6 (27.3)		24 (47.1)
	M		36 (70.6)		21 (67.7)		41 (65.1)		38 (61.3)		16 (72.7)		27 (52.9)
*pfmdr1**		51		31		63		62		22		51	
	W		51 (100.0)		31 (100.0)		63 (100.0)		62 (100.0)		19 (86.4)		51 (100.0)
	M		0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)		3 (13.6)		0 (0.0)
K13		51		31		63		62		22		51	
	W		50 (98.1)		29 (93.5)		61 (93.7)		59 (95.2)		21 (95.4)		51 (100.0)
	M		1 (1.9)		2 (6.5)		2 (3.2)		3 (4.8)		1 (4.5)		0 (0.0)

Discussion

Since the Congolese NMCP introduced ACT as first-line treatment in 2005, whatever some local studies have assessed ACT efficacy, only one national survey, conducted by the NMCP, has been conducted to assess malaria first-line treatment efficacy. But results of this study have not yet been published.

In this study, we reported only 1% (3/280) of our samples that have increased pfmdr1copy number and all of these samples are from Butembo, in the east of the country. This is the first time that amplification of *pfmdr1* gene copy number is assessed in DRC. Our results are similar to those reported from African samples by Uhlemann et al. in Gabon [28], Ngalah et al. in Kenya [29] or Gadalla et al. [30] in Sudan where low prevalence (< 10%) of *pfmdr1 gene* copy number were detected. That seems to be different than in South-east Asia where amplification of *Pfmdr1* copy number is frequently high [26, 31-32]. Duah et al. have incriminated the use of ACT in the occurrence of *P. falciparum* strains with Pfmdr1 amplification in African samples [33]. One other reason to explain this difference could be that mefloquine, a drug that selects lines with increased Pfmdr1 copy number [9], was widely used in Asia

comparatively than in Africa where chloroquine was mostly used, during the monotherapies era.

Increased *Pfmdr1* copy number has been linked with treatment failure (or reduced sensitivity) to some ACT [18, 21, 29, 30, 34]. The discovery for the first time of this increased Pfmdr1 copy number in the East of the DRC emphasizes the importance of maintaining regular monitoring.

As previously observed for SP or CQ, pfmdr1 resistance-based is maybe emerging in the East of the country to before to expand to the rest of the country. Before the present work, only one study assessed *pfmdr1* polymorphism in DRC but by exploring the N86Y mutation [35].

Despite the fact that prevalence of the K76T mutation (related to chloroquine resistance) is still in a high level in our results (65,7 %) and that a cross resistance has been described between chloroquine and amodiaquine [36], the SVMNT haplotype linked to *in vivo* and *in vitro* amodiaquine resistance [37], has not been found in our samples. Currently, this haplotypes have been reported to be present in only five African countries, including two bordering the DRC (Angola and Tanzania) [38-42]. It seems that this haplotype is quite rare in Africa compared to Asia. But continuous use of the artesunate-amodiaquine combination in DRC as first-line treatment could make selection for this resistant strain in the future.

After analysis of the *K13* gene, six different mutations in the propeller domain were detected into nine samples (3,2%). Two mutations (S522C and V520A) have been previously described in other African countries while four mutations are reported for the first time (M476K, F495L, E509D and N523T). The S522C mutation was isolated in a sample collected in Butembo town and has been previously reported in Uganda

[43], which is relatively close Butembo (~80 Km). Due to the important trade and the frequent movement of population between both countries around this geographic area, we can hypothesize that this mutant has disseminated, but it's not excluded that this mutant has independently emerged in DRC. On the other hand, we found the V520A mutation in two sites relatively distant (Luzizila and Mweka).

Our results are similar to those reported by Taylor et al. who found this mutation in DRC too, in the same geographic area than us. In the results provided by Taylor et al. in 2015, this mutation appears to be the most common in African parasites as it has been reported in several African countries (Gambia, Mali, Ghana, Burkina-Faso, Kenya, Tanzania, Malawi and in DRC) [43]. One must ask if this mutation has spread out from one point or if it has appeared spontaneously in many areas. Further phylogenetic analysis could put light on that. Surprisingly, a recent published multi-countries study has not found this mutation but has reported the A578S mutation as the most prevalent in Africa [44]. We have not either found this mutation in our samples.

We found four undescribed mutations on the *K13* gene. The M476K mutation could be of a particular interest because one mutation on this position, the M476I, that appeared *in vitro* after artemisinin pressure in an African line from Tanzania (F32-ART) [16, 45]. Unfortunately, we cannot presently define what are the clinical implications of this mutation. Additionally, the F495L mutation found in Mweka site seems to be close to the Y493H mutation, associated to artemisinin clinical resistance, reported in many parts of South-east Asia [46]. However, the newly reported E509D and N523T mutations are not related or close to resistant polymorphisms described in Asia.

Clearly, none of the mutations clearly correlated to increased parasite clearance time in Asian samples have been found in Africa yet.

Conclusion

The data reported in this study indicate that antimalarial first-lines treatments currently in use in DRC are still good. As in the rest of Africa, resistance to artemisinin is not yet present there. DRC is one of the rare countries that have officially adopted multiple first-line treatment in its policy. This could provide a protective effect to the emergence of resistance strains but discovery of new mutations on the *K13* gene highlights the importance of a continuous monitoring. We unfortunately have not make functional analysis to predict whether these mutations would alter protein function.

References

1. World Health Organization. **World Malaria Report**. Geneva: WHO Press; 2015.
2. WHO. **Global technical strategy for malaria 2016-2030.** Geneva, World Health Organization; 2015
3. Bruce-Chwatt LJ et al. **Chemotherapy of malaria.** Geneva, World Health Organization, 1986.
4. Pradines B, Dormoire J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C: **La résistance aux antipaludiques.** Rev Fr Lab. 2010, 422: 51-62.
5. WHO. **Guidelines for the treatment of malaria.** Third Edition. Geneva, World Health Organization; 2015

6. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD: **Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis.** Lancet 2012, 379:413–431.
7. Phillips M, Phillips-Howard PA**.** ***Economic implications of resistance to antimalarial drugs.*** Pharmacoeconomics 1996, 10:225–238.
8. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. ***History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance.*** Clinical and Microbiology Reviews2004, 17:235–254.
9. Price RN, Nosten F. ***Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention.*** Drug Resistance Updates 2001, 4:187–196.
10. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, Kokwaro G, Ouma J, Hien TT, Molyneux ME, Taylor TE, Newbold CI, Ruebush TK, Danis M, Greenwood BM, Anderson RM, Olliaro P: ***Averting a malaria disaster.*** Lancet 1999, 353:1965–1967.
11. WHO. ***Update on artemisinin and ACT resistance, April 2016***. Geneva, World Health Organization; 2016
12. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, et al. ***World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria.*** Malar J. 2007;6:121. doi: 10.1186/1475-2875-6-121.
13. Mvumbi DM, Kayembe N, Situakibanza NT, Bobanga L, Mvumbi L, De Mol P & Hayette MP: ***Falciparum malaria molecular drug resistance in the Democratic Republic of Congo: a systematic review.*** Malar J 2015,14:354
14. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. ***A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.*** N Engl J Med 2001;344:257–63
15. Sa JM, Twu O: ***Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and***

spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type. Malar J 2010, 9:374.

16. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. ***A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.*** Nature. 2014; 13:50–55.
17. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE. ***Role of pfmdr1 amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in Plasmodium falciparum.*** Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:2455–64.
18. Lobo E, de Sousa B, Rosa S, Figueiredo P, Lobo L, Pateira S, et al. ***Prevalence of pfmdr1 alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisinin-based combination therapy***. Malar J. 2014;13:300.
19. Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, Day NP, et al. ***Plasmodium falciparum pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness.*** Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1509–15.
20. Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. ***Decreasing pfmdr1 copy number inPlasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin.*** J Infect Dis. 2006;194:528–35.
21. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. *pfmdr1* ***copy number and arteminisin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia.*** Malar J. 2009;8:11.
22. Ngalah BS, Ingasia LA, Cheruiyot AC et al. Analysis ***of major genome loci underlying artemisinin resistance and pfmdr1 copy number in pre- and post-***

ACTs in western Kenya. Sci Rep 2015;5:8308.

23. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Lelo M, Lengu B, Nani-Tuma S, et al. ***Assessment of pfcrt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa. Democratic Republic of Congo.*** Malar J.2013;12:459.
24. Cnops L, Jacobs J and Van Esbroeck M. ***Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections***. ClinMicrobiol Infect 2011; 17: 1101–1107
25. WWARN. ***Copy number estimation of P. falciparum pfmdr1.*** Molecular Module 2011.
26. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. ***Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number.*** Lancet. 2004; 364: 438–47.
27. Mvumbi DM, Bobanga L, Melin P, De Mol P, Kayembe N, Situakibanza NT, Mvumbi L, Nsibu N, Umesumbu S, & Hayette MP. ***High prevalence of Plasmodium falciparum infection in asymptomatic individuals from the Democratic Republic of Congo.*** Malar Res Treat 2016, Article ID 5405802. doi:10.1155/2016/5405802
28. Uhlemann AC, Ramharter M, Lell B, Kremsner PG, Krishna S: ***Amplification of Plasmodium falciparum multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon.*** J Infect Dis. 2005, 192: 1830-1835. 10.1086/497337.
29. Ngalah BS, Ingasia LA, Cheruiyot AC, Chebon LJ, Juma DW, Muiruri P, Onyango I, Ogony J, Yeda RA, Cheruiyot J, Mbuba E, Mwangoka G, Achieng AO, Ng'ang'a Z, Andagalu B, Akala HM, Kamau E 2015. ***Analysis of major genome loci underlying artemisinin resistance and pfmdr1 copy number in pre- and post-ACTs in western Kenya.*** Sci Rep 5:8308.
30. Gadalla NB, Adam I, Elzaki SE, Bashir S, Mukhtar I, Oguike M, et al.

Increased pfmdr1 copy number and sequence polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Sudanese malaria patients treated with artemether-lumefantrine. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:5408–5411.

31. Mungthin M, Khositnithikul R, Sitthichot N, Suwandittakul N, Wattanaveeradej V, Ward SA, et al. ***Association between the pfmdr1 gene and in vitro artemether and lumefantrine sensitivity in Thai isolates of Plasmodium falciparum.*** Am J Trop Med Hyg. 2010;83:1005–1009.
32. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. ***pfmdr1 copy number and arteminisin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia.*** Malar J. 2009;8:11.
33. Duah NO, Matrevi SA, de Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, et al. ***Increased pfmdr1 gene copy number and the decline in pfcrt and pfmdr1 resistance alleles in Ghanaian Plasmodium falciparumisolates after the change of anti-malarial drug treatment policy.*** Malar J. 2013;12:377.
34. Dokomajilar C, Nsobya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ and Dorsey G. ***Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic.*** Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1893–1895.
35. Mobula L, Lilley B, Tshefu AK, Rosenthal PJ: ***Resistance-mediating Polymorphisms in Plasmodium falciparum infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.*** Am J Trop Med Hyg 2009, 80:555–558.
36. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A: ***Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the Plasmodium falciparum multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan.***

Am J Trop Med Hyg 2003, 69:184–187.

37. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, Durrani N, Leslie T, Rowland M, Hallett RL: ***Amodiaquine resistance in Plasmodium falciparum malaria in Afghanistan is associated with the pfcrt SVMNT allele at codons 72 to 76.*** Antimicrob Agents Hemother 2010, 54:3714–3716.

38. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, Vestergaard LS, Staalsoe T, Jensen AT, Enevold A, Ronn AM, Khalil IF, Warhurst DC, Lemnge MM, Theander TG, Bygbjerg IC: ***Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in Plasmodium falciparum in Tanzania.*** J Infect Dis 2006, 193:1738–1741.

39. Mehlotra RK, Mattera G, Bockarie MJ, Maguire JD, Baird JK, Sharma YD, Alifrangis M, Dorsey G, Rosenthal PJ, Fryauff DJ, Kazura JW, Stoneking M, Zimmerman PA: ***Discordant patterns of genetic variation at two chloroquine resistance loci in worldwide populations of the malaria parasite Plasmodium falciparum.*** Antimicrob Agents Chemother 2008, 52:2212–2222.

40. Gama BE, de Carvalho GA P, LutucutaKosi FJ, de Oliveira NK A, Fortes F, Rosenthal PJ, Daniel Ribeiro CT, da Cruz MD F: ***Plasmodium falciparum isolates from Angola show the SVMNT haplotype in the pfcrt gene.*** Malar J 2010, 9:174.

41. Mekonnen SK, Aseffa A, Berhe N, Teklehaymanot T, Clouse RM, Gebru T, et al. ***Return of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum parasites and emergence of chloroquine-resistant Plasmodium vivax in Ethiopia.*** Malar J. 2014;13:244.

42. Ngassa Mbenda HG, Das A. ***Occurrence of multiple chloroquine-resistant Pfcrt haplotypes and emergence of the S(agt) VMNT type in Cameroonian Plasmodium falciparum.*** J Antimicrob Chemother.

2014;69:400–3.

43. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, et al. ***Absence of putative artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study.*** J Infect Dis 2015; 211: 680-8.

44. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul‐Alam M, Amodu O, Rahim‐Awab G, Barnadas C et al. A ***Worldwide Map of Plasmodium falciparum K13-Propeller Polymorphisms.*** N Engl J Med 2016;374:2453–64

45. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X, Berry A, et al**.** ***Increased tolerance to artemisinin in Plasmodium falciparum is mediated by a quiescence mechanism.*** Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:1872–1877.

46. Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, et al. ***Independent emergence of artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in Southeast Asia.*** J Infect Dis. 2015;211:670–679.

Les résultats de ces deux études sont en accord avec les données des travaux similaires du moment ainsi que celles de l'OMS : les CTA utilisées actuellement en Afrique de manière général et en RDC en particulier sont toujours efficaces !

Néanmoins, les frontières virtuelles africaines favorisent grandement le flux de population d'un Etat à un autre avec comme conséquence un échange de souches plasmodiales avec leurs bagages génétiques, mutés ou pas. La présence de la mutation S522C sur le *K13* par exemple dans le Nord-kivu, frontalier de l'Uganda où cette mutation a été précédemment trouvée, illustre bien ce fait.

Par ailleurs, l'apparition de mutations nouvelles sur le *K13* en Afrique et en RDC suscite quelques questionnements: la résistance à l'artémisinine en Afrique, si avérée, ne pourrait-elle pas avoir des bases génétiques différentes de celles répertoriées en Asie ? Cette résistance ne pourrait-elle pas apparaître *de novo* en lieu et place d'être exportée de l'Asie ? Des travaux futurs y répondront certainement.

Le contexte particulier de la RDC revêt une certaine controverse : plusieurs facteurs favorisants co-existent rendant l'apparition des résistances aux CTA fortement probable (fréquence des infections, faible réglémentation de l'importation, de la vente et de la circulation des antipaludiques, automédication, mauvaise utilisation des CTA dont la qualité n'est généralement pas garantie, etc….) pendant que la RDC est un des rares pays ayant adopté simultanément deux CTA dans sa politique nationale de prise en charge du paludisme (artésunate-amodiaquine et artémether-luméfantrine). Au lieu d'être soumis à 2 molécules, les parasites congolais subissent « en théorie » une pression de 4 molécules distinctes, retardant donc l'apparition de résistances à l'une d'entre elles. Plusieurs scientifiques décrivent l'utilisation des « multiple first-line therapies » (MFT) comme conférant un effet protecteur. Il serait donc intéresant d'observer l'évolution des choses dans le temps…

Partie IV :

Discussion générale et conclusion

Comme pour tant d’autres pathologies infectieuses ou pas, les nombreux progrès réalisés en biologie moléculaire depuis le siècle dernier ont permis d’effectuer de grands changements dans la compréhension des maladies, d’énoncer de nouvelles théories, d’en reconsidérer certaines et parfois même de revoir ou préciser l’étiologie alors admise. Au travers de cette rédaction, nous avons voulu souligner l'importance qui est celle de cette discipline dans certains aspects de la recherche sur le paludisme à savoir l'épidémiologie, le diagnostic et la chimiosensibilité du parasite en cause aux molécules antipaludiques.

IV.1. Epidémiologie et diagnostic

Outre l'observation clinique des patients, l’examen microscopique est demeuré pendant longtemps le seul outil diagnostic disponible et fiable pour l'identification du parasite. Malheureusement, ce procédé étant fortement dépendant des capacités visuelles de l’examinateur (et de sa formation), il est vite apparu que la lecture des gouttes épaisses ainsi que des frottis minces comportait certaines limites. Bien que cette technique soit utilisée depuis plus d'un siècle, à ce jour beaucoup de lacunes sont néanmoins encore observées dans l’interprétation des résultats. Mukadi et al. le démontrent clairement dans leur étude réalisée dans 174 laboratoires répartis dans 4 provinces de la RDC évaluant cette méthode dans laquelle moins de 30% de ces laboratoires ont été capables d’'interpréter correctement la lecture de trois lames test [1]. Une des principales raisons évoquée par les auteurs est en rapport avec la formation des laborantins. Mais quand bien même la formation serait améliorée et une formation continue prévue, l’œil humain conservera toujours des limites. Il y aura donc toujours un seuil de détection infranchissable par l’œil. Les TDR qui ont été mis au point afin de pallier à certaines faiblesses de l’examen microscopique (temps de réalisation, qualification de l’examinateur, appareillage, colorants, etc) n'ont par ailleurs pas réglé un des problèmes majeurs de la microscopie: la sensibilité. Mais encore, plusieurs auteurs rapportent que certaines infections identifiées par l'examen microscopique ne le sont pas par les TDR [2-4]. De plus, la persistance d'un des antigènes ciblés par ces tests (l’HRP-2) après que le parasite ait déjà été éliminé de l’organisme entraine plusieurs résultats positifs

sans significations cliniques dans les études communautaires. Ce temps de persistance a été estimé à 35 et 42 jours selon le degré d'endémicité où l'on se trouve [5].

Or tout le système de prise en charge du paludisme en RDC (conditionné par un diagnostic obligatoire en amont) est essentiellement fondé sur ces deux techniques. En effet, dans l'organisation du système de santé en RDC, les TDR sont systématiquement réalisés dans les structures sanitaires périphériques sans laboratoires pour tout cas de fièvre et la goutte épaisse + frottis mince sont "en principe" réalisés dans toutes les structures ayant un laboratoire. Ceci amène à deux conclusions logiques: primo, une bonne partie des infections ne sont pas diagnostiquées soit à cause des limites (techniques, financières ou humaines) relatives à chaque procédé et secundo les prévalences liées au paludisme par les autorités sanitaires sont sous-évaluées. Or de ces prévalences dépend le type et l'ampleur des interventions à mener.

En effet, la distribution (de masse ou de routine) des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'approvisionnement des structures sanitaires publiques en CTA et en TDR sont planifiées en fonction d'une subdivision territoriale du pays basée sur la prévalence moyenne d'infections palustres, diagnostiquées par microscopie et/ou les TDR. Ceci voudrait dire par exemple que pour une aire géographique donnée, si les données reçues déclarent une prévalence de 22%, ce chiffre serait soit une sous-estimation (vu les lacunes soit de la technique, soit du technicien, soit des deux) soit une surestimation en tenant compte des positifs dû à la persistance de l'HRP-2 ou encore des techniciens lisant des lames de mauvaises qualités. A coup sûr, les TDR et la microscopie ne reflètent pas la situation réelle.

Les travaux publiés et présentés dans cette thèse ont démontré à suffisance la précision augmentée qu'offrait le diagnostic moléculaire. La PCR en temps réel que nous avons utilisé pour identifier le parasite, développée par Rougemont et al. [6] et améliorée par Cnops et al. [7], atteint des niveaux très élevés de sensibilité d'environ 10.000 fois celle de la microscopie, donc bien au-delà de ce que l'œil de l'examinateur le plus expérimenté pourrait observer à travers l'objectif d'un microscope. La PCR permet de rattraper beaucoup de ces

infections non décelées et peut améliorer grandement la manière de considérer l'épidémiologie du paludisme [8-10].

Dans son plan stratégique quinquennal 2016-2020 [11], le PNLP de la RDC a procédé à une stratification en fonction de la prévalence parasitaire (déterminée sur base des résultats de la microscopie et/ou des TDR) divisant le pays en 4 strates : une zone de pré-élimination (Nord-Kivu), deux zones de contrôle (phase de consolidation) et une zone de contrôle (phase d'intensification) (figure 28). Les interventions de lutte contre le paludisme étant différentes d'un stade à l'autre du processus vers l'élimination, il est clair que si un meilleur diagnostic (plus sensible) était appliqué en lieu et place des TDR ou de la goutte épaisse, une zone considérée comme en phase de pré-élimination (prévalence inférieure ou égale à 5%) pourrait se retrouver en phase de contrôle (6-30%). Ce qui modifierait les interventions prévues pour telle ou telle zone et de surcroit leur impact. Améliorer la lutte antipaludique est très dépendante donc de moyens de mesure corrects et surtout précis. L'application des méthodes diagnostiques de biologie moléculaire à tous les niveaux de la pyramide sanitaire reconfigurerait certainement, à notre avis, la carte épidémiologique de la RDC.

Dans la stratégie technique mondiale contre le paludisme pour la période 2016-2030 édictée par l'OMS, la vision est celle d'un monde sans paludisme pour laquelle des objectifs intermédiaires ont été définis (en 2020 et en 2025) visant à réduire progressivement le poids de cette pathologie [12]. Les Etats alignés sur cette stratégie devront, une fois en phase de pré-élimination ou d'élimination, s'octroyer des moyens diagnostiques plus précis devant être mis à contribution dans les stratégies de lutte et c'est ici que le diagnostic moléculaire trouve tout son intérêt [13-14].

Par ailleurs, vu le contexte épidémiologique de la RDC (où 97% de la population est annuellement soumise aux piqûres d'anophèles) la prémunition est vite acquise, permettant une parasitémie inframicroscopique sans manifestations cliniques [3, 15-16]. Ceci souligne le fait qu'au-delà des patients impaludés qui consultent dans une structure de soins dont le diagnostic (par goutte épaisse ou par TDR) est reporté négatif, il existe une autre frange de la

population « asymptomatique » qui ne se rend pas dans les formations sanitaires car ne requérant à priori aucun soin, mais qui est porteuse de parasites et qui échappe à la chaîne de transmission de l'information sanitaire.

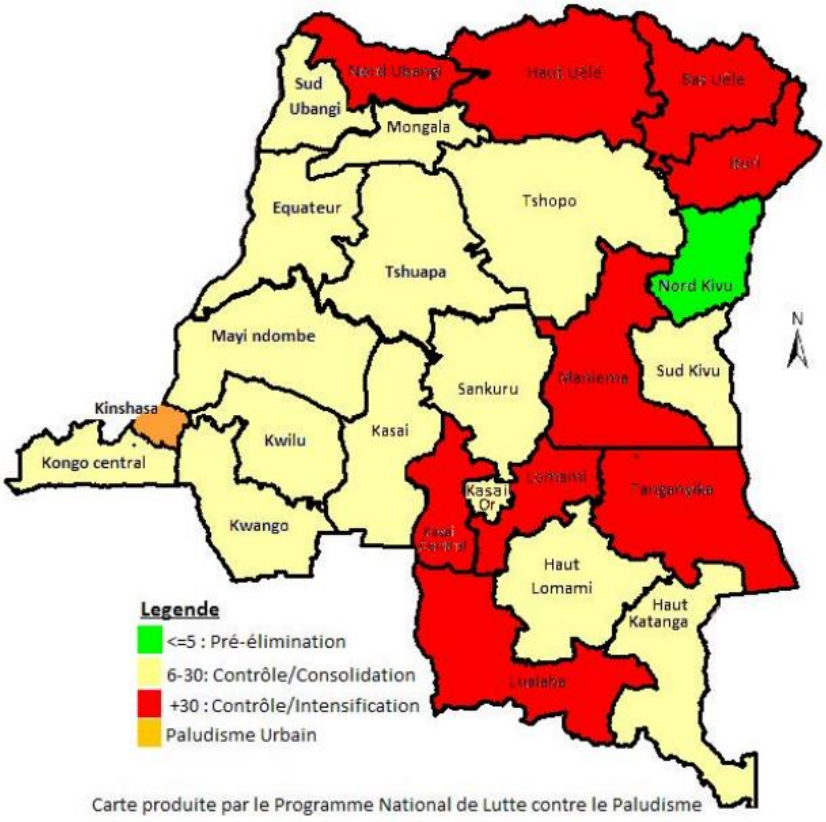


Figure 28. Stratification de la RDC selon le taux de prévalence parasitaire (du Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2016-2020, PNLP)

Pour rappel, la majorité des données disponibles au sein du Ministère de la Santé en rapport avec l'incidence ou la prévalence liées au paludisme proviennent des structures hospitalières et donc ces données épidémiologiques ne prennent pas en compte ces individus asymptomatiques; ce qui constitue un biais dans le processus d'extrapolation de ces valeurs à la population globale.

La troisième publication de ce travail a fourni, toujours grâce aux techniques moléculaires, une preuve supplémentaire de l'importance du portage asymptomatique de *P. falciparum* dans la communauté en RDC. Vu les très faibles parasitémies souvent retrouvées chez ces individus, le diagnostic moléculaire reste l'examen de choix pour l'identification et la

détection des parasites [17-19]. Les interventions thérapeutiques dirigées contre ces porteurs asymptomatiques sont en RDC quasi nulles, si ce n'est le traitement préventif intermittent (TPI), qui n'atteint qu'une faible proportion de ces porteurs en l'occurrence les femmes enceintes. Le reste des porteurs asymptomatiques (les hommes, les femmes non gravides et les enfants) ne bénéficient, en termes d'intervention, que d'une prévention par moustiquaire, mais encore cette couverture n'est pas globale [11]. Or ces porteurs asymptomatiques constituent un énorme réservoir de plasmodium plus important que les malades [20].

L'élimination du paludisme, vision actuelle de l'OMS, ne saurait être effective si des mesures visant à identifier et traiter ces sujets asymptomatiques ne sont pas prises. Les stratégies proposées afin de réussir le pari de l'élimination mentionnent toutes en majorité l'usage de moyens diagnostics moléculaires comme étant l'outil de choix [21-22]

L'épidémiologie globale du paludisme en RDC en particulier et dans toutes les zones endémiques en général serait donc bien différente si elle se fondait sur des données obtenues grâce à la biologie moléculaire.

IV.2. Résistance aux molécules antipaludiques

L'utilisation adéquate des molécules antipaludiques en combinaisons est aujourd'hui la seule arme efficace utilisée par les programmes nationaux contre l'infection palustre, étant donné l'absence actuelle d'un vaccin disponible probant. La capacité de *P. falciparum* à développer des mécanismes de résistance aux molécules lui soumises entrave gravement les efforts fournis en vue de l'élimination ou même du contrôle de cette endémie [23-24].

Les études présentées dans cette thèse ont permis d'effectuer une photographie à un temps "t" de la situation des souches circulantes (dans les aires géographiques concernées bien entendu) de *P. falciparum* en rapport avec leur capacité « théorique » à survivre et à se développer si elles étaient mises en présence d'un ou de plusieurs antipaludiques. Ceci est un premier avantage dévolu à l'usage des marqueurs moléculaires de résistance. Sur un seul échantillon, si le prélèvement est bien effectué, l'on peut analyser plusieurs marqueurs

moléculaires de résistance permettant de prédire approximativement le scénario qui se présenterait si telle molécule était utilisée dans telle contrée. Les résultats fournis par les tests *in vivo* ne concernent que les molécules utilisées lors du test et ne permettent que de déclarer si la combinaison employée est encore efficace sans préciser l'efficacité de chacune des molécules individuellement. Pour exemple, si un patient a présenté un échec thérapeutique après traitement avec la combinaison A-B, il sera déclaré que la combinaison A-B a perdu de son efficacité sans pouvoir dire avec précision si c'est la molécule A ou la molécule B qui en est responsable. Un second avantage est la rapidité d'obtention des résultats. Si l'on additionne le temps de collecte des échantillons et le temps de réalisation des techniques (extraction d'ADN, amplification génique et/ou séquençage), la durée totale pour l'obtention des résultats sera toujours inférieure, pour une taille d'échantillon similaire, à la durée d'une étude clinique (tests *in vivo*) où rien que le temps imparti au suivi des patients peut aller jusqu'à 48 voire même 63 jours ! [25] Avec les marqueurs moléculaires, les résultats liés aux échantillons collectés sur les patients au J0 suffisent sans avoir besoin de les suivre un jour de plus! Les tests in vivo conservent néanmoins une importance non négligeable surtout lorsqu’aucun marqueur moléculaire de résistance à une molécule n’a encore été découvert.

Les échantillons ayant servi pour l'analyse des marqueurs moléculaires de résistance, s'ils sont adéquatement collectés et conservés, s’ils peuvent servir pour décrire une situation présente, ils pourraient aussi resservir dans le futur pour l'analyse de marqueurs de résistance non encore découverts à ce jour. C'est ainsi que par exemple Chan et al [26] ont pu rétrospectivement analyser le *pfcrt* sur des échantillons datant d’une période allant des années 1959-1979 et y déceler la mutation K76T huit ans avant les premiers reports de résistance à la chloroquine dans la région concernée. De même, dans un des travaux présenté dans cette thèse, nous avons pu étudier la situation de la résistance à la chloroquine alors que cette molécule n'est plus utilisée à ce jour. Cela tire un intérêt dans la possibilité de réintroduire des anciennes molécules bon marché retirées si une réversion presque totale de sensibilité des souches se produisait, comme cela a été observé au Malawi [27].

A l'ère où la crainte de l'apparition de souches résistantes à l'artémisinine en Afrique est grande, la biologie moléculaire fournit une approche intéressante [28]. Lors de la découverte de la mutation K76T sur le gène *pfcrt* ou des mutations sur les gènes *dhps* ou *dhfr*, respectivement corrélés à la résistance à la chloroquine et aux antifolates, la résistance à ces molécules était déjà présente sur tous les continents endémiques. Il n'était donc plus question d'éviter leur propagation mais de constater leur présence et d'en évaluer l'ampleur. Mais pour la résistance à l'artémisinine, qui pour l'instant n'est géographiquement limitée qu'à l'Asie du Sud-est [29], l'analyse de ce marqueur (ou d'autres qui pourraient être découverts par la suite) sur des échantillons africains de manière séquentielle nous permettra de surveiller l'apparition de souches résistantes à l'artémisinine mais surtout de prendre des mesures de confinement et/ou de lutte à temps.

Nous devons néanmoins admettre que le couplage de différentes méthodes d'évaluation de l'efficacité des antipaludiques donnerait des résultats plus parlants. Il est vrai que l'identification d'un marqueur moléculaire sur des échantillons provenant d'un échec thérapeutique observé lors d'une étude clinique a plus de valeur scientifique que s'il est identifié sur un sujet sain sans historique d'aucune de prise d'antipaludique. Ceci constitue une des faiblesses de nos travaux qui ne se sont fondés essentiellement sur la sélection de sujets dans la communauté. Mais quand même, avoir une idée de la proportion de souches mutantes circulant dans la communauté demeure un élément nécessaire. Par exemple si des modèles prédictifs sont développés dans le futur (basés sur la corrélation entre incidence des échecs au traitement et fréquence des marqueurs moléculaires de résistance), l'on pourrait uniquement se baser sur une analyse de quelques échantillons dans la communauté pour surseoir aux lourdes études in vivo afin de prédire le niveau d'échecs dans les structures sanitaires, dans une zone précise bien entendu.

De nombreux autres aspects d'importance liés à la contribution de la biologie moléculaire sur l'étude de la résistance n'ont pas été abordés dans nos travaux. Un qui n'en est pas des moindre est la différenciation entre réinfection et recrudescence! Cette information est d'une utilité capitale lors des tests *in vivo* car s'il n'est pas possible de faire cette discrimination, les

résultats pourraient être biaisés. En effet, il est impossible par l'examen microscopique de savoir si les parasites présents chez un individu au J7 post-traitement sont les mêmes que ceux de l'infection initiale ou s'ils proviennent d'une nouvelle infection. L'analyse moléculaire de deux gènes des protéines de surface du mérozoïte (MSP1 et MSP2) sont généralement utilisés à cette fin [30].

Conclusion

La biologie moléculaire occupe aujourd'hui une place de choix dans la majorité des domaines liés à la recherche sur le paludisme ; cela ayant été rendu possible grâce à la disponibilité du génome complet de *P. falciparum*. Auparavant, cette discipline était réservée uniquement aux laboratoires spécialisés de l'occident mais aujourd'hui de plus en plus de laboratoires des pays en voies de développement appliquent des techniques moléculaires. Mais l'utilisation de ces techniques en routine, en dehors du cadre de la recherche demeure hypothétique suite à l'énormité des coûts liés à leur réalisation. Tant les thermocycleurs sont des instruments très chers, tant les réactifs nécessaires le sont aussi. Bien que certaines institutions publiques (universités, instituts de recherches, etc) ont pu acquérir, via des financements de projets, de l'équipement pour réaliser de la biologie moléculaire, souvent ce matériel est inutilisé faute de personnel formé et disponible. De plus, les conditions pour le respect de la chaîne du froid ne sont pas toujours réunies.

Nous estimons que l'application de ces techniques dans un premier temps sur quelques échantillons sélectionnés de manière réfléchie pourrait néanmoins être envisagée pour un contrôle de qualité des méthodes diagnostiques actuelles ainsi que pour la surveillance périodiques de la sensibilité des souches de *P. falciparum* aux antipaludiques circulants. Mais pour cela une mise en commun d'efforts devrait être consentie entre les autorités sanitaires, les institutions de recherches et les bailleurs de fonds.

Perspectives

Les travaux constituant cette thèse peuvent, en dépit de leur originalité avérée, être considérés comme des études pilotes devant entrainer des études sur de plus larges échantillons et dans plusieurs autres lieux en regard des dimensions de la RDC. Ceci permettrait d'offrir une plus grande représentativité, très souvent difficile à obtenir dans le contexte du paludisme.

Plus les interventions de lutte listées dans le Plan Stratégique Nationale de lutte contre le paludisme rédigé par le PNLP passeront à l'échelle, il est à supposer que la prévalence du paludisme en RDC continuera de baisser. Ainsi certaines zones passeront progressivement en phase de pré-élimination et plus tard en phase d'élimination. A ce stade, la surveillance épidémiologique devra s'efforcer d'identifier et de réagir rapidement face à tous les nouveaux cas, idéalement dans les 24 heures. Une des méthodes des plus adoptée à cette phase est la détection réactive des cas (reactive case detection = RACD) appliquée déjà dans certains pays [31].

Pour ce faire, cette détection devrait idéalement se faire grâce à un diagnostic de grande précision, en l'occurrence moléculaire. La RDC pourrait inclure cette technique dans sa stratégie pour les zones qui arriveraient en phase d'élimination. Mais le diagnostic par PCR requérant un appareillage et des réactifs couteux, de nouvelles approches d'amplification génique (pratiques et à moindre coûts) peuvent déjà être envisagées à ce jour. Nous pensons ici à la « Loop-mediated isothermal amplification assay » (LAMP) qui, contrairement aux autres techniques conventionnelles d'amplification, ne requiert point de thermocycleur pour sa mise en oeuvre, étant donné que l'amplification de manière isothermique [32-33].

Cette technique a déjà été évaluée sur le terrain comme par exemple en Thaïlande [34], en Ethiopie [35], Ou encore en Ouganda [36] et semble bien fonctionner. Des kits commerciaux à ce jour d'ailleurs disponibles [37].

Des études évaluant la faisabilité de son implantation dans les stratégies de lutte en RDC devraient être conduites.

En rapport avec la surveillance de la résistance, les mutations nouvelles décrites sur le k13 devraient être étudiées de manière plus approfondie afin de déterminer leurs impacts sur la sensibilité des souches de *P. falciparum* par rapport à l'artémisinine et ses dérivés, de manière spécifique à la RDC. Mais aussi, ce travail appelle à une réflexion sur la mise en place d'un système de surveillance de la résistance du parasite aux antipaludiques fondé sur l'analyse des marqueurs moléculaires de résistance (couplable à d'autres méthodes d'évaluation).

La voie est donc ouverte…

.

Références

1. Mukadi P, Gillet P, Lukuka A, Atua B, Kahodi S, Lokombe J, Muyembe J and Jacobs J. ***External quality assessment of malaria microscopy in the Democratic Republic of the Congo***. Malar J 2011; 10:308
2. Ishengoma DS, Shayo A, Mandara CI, Baraka V, Madebe RA, Ngatunga D, et al. **The role of malaria rapid diagnostic tests in screening of patients to be enrolled in clinical trials in low malaria transmission settings**. Health Syst Policy Res. 2016;3:2.
3. Mukomena SE, Mulenga CP, Mashinda KD, Lutumba TP, Mapatano MA et Numbi LO. ***Parasitémie asymptomatique chez les enfants de moins de 5 ans, enfants en âge scolaire et prise en charge des épisodes fébriles dans les ménages de Lubumbashi, République Démocratique du Congo.*** Pan Afr Med J 2016; 24: 94
4. Mahende C, Ngasala B, Lusingu B, Yong TS, Lushino P, Lemnge M, Mmbando B and Premji Z. ***Performance of rapid diagnostic test, blood-film microscopy and PCR for the diagnosis of malaria infection among febrile children from Korogwe District, Tanzania.*** Malar J 2016. Malar J. 2016; 15: 391.
5. Grandesso F, Nabasumba C, Nyehangane D, Page A, Bastard M, De Smet M, Boum Y, Etard J. **Performance and time to become negative after treatment of three malaria rapid diagnostic tests in low and high malaria transmission settings .** Malar J 2016, **15** :496
6. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K: ***Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays.*** J Clin Microbiol. 2004, 42: 5636-5643.
7. Cnops L, Jacobs J and Van Esbroeck M. ***Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections.*** Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1101–1107

8. Conway DJ. ***Molecular epidemiology of malaria.*** Clin Microbiol Rev. 2007;20:188–204.
9. Taylor SM, Messina JP, Hand CC, Juliano JJ, Muwonga J, Tshefu AK, et al. ***Molecular malaria epidemiology: mapping and burden estimates for the Democratic Republic of the Congo,*** 2007. PLoS One. 2011;6:e16420
10. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. ***Malaria molecular epidemiology: lessons from the international centers of excellence for malaria research network.*** Am J Trop Med Hyg. 2015;93:79–86
11. Ministère de la Santé Publique de la RDC/PNLP. ***Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme 2016-2020***.
12. World Health Organization. ***Stratégie Technique Mondiale De Lutte Contre Le Paludisme 2016– 2030.*** Geneva: WHO Press; 2015.
13. Yekutiel P. ***Problems of epidemiology in malaria eradication.*** Bull World Health 1960.
14. Moonen B, Cohen JM, Snow RW, Slutsker L, Drakeley C, et al. ***Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination.*** Lancet 2010; 376: 1592–1603.Organ 22: 669–683.)
15. Ilombe G, Maketa V, Mavoko HM, da Luz RI, Lutumba P, Van geertruyden JP. ***Performance of HRP2-based rapid test in children attending the health centre compared to asymptomatic children in the*** community. Malar J. 2014;13:308.
16. Maketa V, Mavoko HM, da Luz RI, Zanga J, Lubiba J, Kalonji A, et al. ***The relationship between Plasmodium infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*** Malar J. 2015;14(1):83
17. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, et al. ***The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria.*** Malar J. 2012;11:29.

18. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "***Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated.*** PLoS Med. 2016; 13:e1001942.

19. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. ***Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance.*** Nature reviews Microbiology. 2014;12(12):833–40.

20. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. ***The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission.*** Expert Rev Anti Infect. 2013;11(6):623–39.)

21. Moonen B, Cohen JM, Snow RW, Slutsker L, Drakeley C, Smith DL, et al. ***Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination.*** Lancet. 2010;376:1592–1603.

22. Sturrock HJ, Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, Bousema T, et al. ***Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination.*** PLoS Med. 2013;10(6):e1001467.

23. Farooq U, Mahajan RC. ***Drug resistance in malaria.*** J Vector Borne Dis. 2004; 41:45–53.

24. Lubell Y, Dondorp A, Guerin PJ, Drake T, Meek S, Ashley E, et al. ***Artemisinin resistance-modelling the potential human and economic costs.*** Malar J. 2014;13:452.

25. OMS. ***Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à plasmodium falciparum non compliqué***. Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 2004.

26. Chan CW, Spathis R, Reiff DM, McGrath SE, Garruto RM, Lum JK. ***Diversity of Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcrt) exon 2 haplotypes in the Pacific from 1959 to 1979.*** PLoS ONE. 2012;7:e30213.

27. Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalamala FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV. ***Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi.*** N Engl J Med. 2006;355:1959–1966.

28. Talisuna AO, Karema C, Ogutu B, Juma E, Logedi J, Nyandigisi A, et al. ***Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems.*** Lancet Infect Dis. 2012;12:888–896.
29. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. ***A worldwide map of Plasmodium falciparum K13-propeller polymorphisms.*** N Engl J Med. 2016;374:2453–64.
30. Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G. ***Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp.*** Am J Trop Med Hyg. 2003;68:133–139.
31. Sturrock HJ, Novotny JM, Kunene S, Dlamini S, Zulu Z, Cohen JM, et al. ***Reactive case detection for malaria elimination: real-life experience from an ongoing program in Swaziland.*** PLoS ONE. 2013;8(5):e63830.
32. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. ***Loop-mediated isothermal amplification of DNA.*** Nucleic Acids Res. 2000;28:E63.
33. Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. ***Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification***, *Clin Chem*, 2006, 52:302-306
34. Chutipongvivate S, Prompunjai Y, Neadruengsang W, Wangsiricharoen S. ***Alternative malaria diagnostic tools: evaluation of Plasmodium falciparum detection along Thailand's border by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Immunochromatographic Test (ICT)*** J Trop Dis. 2014;2:147–147.
35. Sema M, Alemu A, Bayih AG, Getie S, Getnet G, Guelig D. ***Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia.*** Malar J. 2015;14:44–44.

36. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C,Agaba B, Kyabayinze DJ, Sutherland CJ, Perkins MD, Bell D. 2013. ***Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda.*** J. Infect. Dis. 208:645–652.
37. Lucchi NW, Gaye M, Diallo MA, Goldman IF, Ljolje D, Deme AB, Aida BY, Ndiaye D, Barnwell JW, Udhayakumar V & Ndiaye D. ***Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites.*** *Sci Rep*. 2016; 6: 36808.