



HAL
open science

Résistance de *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine au Cambodge et au Cameroun : épidémiologie, mécanismes et nouvelles options thérapeutiques

Mélissa Mairet

► **To cite this version:**

Mélissa Mairet. Résistance de *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine au Cambodge et au Cameroun : épidémiologie, mécanismes et nouvelles options thérapeutiques. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30283 . tel-03279353

HAL Id: tel-03279353

<https://theses.hal.science/tel-03279353v1>

Submitted on 6 Jul 2021

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Melissa MAIRET

Le 22 juin 2020

**Résistance de Plasmodium falciparum aux Combinaisons
Thérapeutiques à base d'Artémisinine au Cambodge et au
Cameroun : épidémiologie, mécanismes et nouvelles options
thérapeutiques.**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Unité de recherche :

CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Thèse dirigée par

Antoine BERRY et Benoit WITKOWSKI

Jury

M. Leonardo BASCO, Rapporteur

M. Pascal MILLET, Rapporteur

Mme Françoise BENOIT-VICAL, Examinatrice

M. Jean-Christophe BARALE, Examineur

M. Antoine BERRY, Directeur de thèse

M. Benoit WITKOWSKI, Co-directeur de thèse

RÉSUMÉ

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont depuis vingt ans les médicaments de référence pour le traitement du paludisme causé par *Plasmodium falciparum*. Les CTA se composent de deux molécules antipaludiques : un dérivé d'artémisinine à action rapide et brève, et une molécule partenaire à action plus lente mais prolongée. Leur mise en place globale a contribué à la diminution drastique de la mortalité liée au paludisme.

La mondialisation des CTA a permis à de nombreux pays endémiques de tendre vers l'élimination du paludisme. L'accomplissement de cet objectif se heurte cependant à l'émergence de résistances à l'artémisinine et aux composés partenaires. Cette problématique est particulièrement présente au Cambodge, et s'étend maintenant à une grande partie de l'Asie du Sud-Est. La perte de l'efficacité des CTA en Afrique aurait de lourdes conséquences en termes de santé publique, c'est pourquoi des stratégies de surveillance des résistances doivent être mises en place pour pallier à ce risque.

De précédentes études ont permis de mettre en place de nouveaux tests phénotypiques participant à la découverte de marqueurs moléculaires de résistance aujourd'hui utilisés pour la surveillance de l'efficacité des traitements. La première partie de ce travail a visé à mieux définir, en utilisant ces outils, l'épidémiologie de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux CTA en Asie et en Afrique. Nos recherches se sont concentrées sur deux pays stratégiques : le Cambodge, pays à faible transmission mais qui est l'épicentre de l'émergence des résistances aux composés antipaludiques, et le Cameroun, pays à forte transmission d'Afrique centrale, dont la résistance aux CTA n'a pas encore été rapportée. Dans une deuxième partie, de nouvelles options thérapeutiques ont été testées cliniquement et/ou *in vitro* sur des parasites multi-résistants isolés au Cambodge. Enfin, une troisième partie a étudié les mécanismes de résistance à l'artémisinine additionnels aux polymorphismes du gène *Kelch13*, en associant culture *in vitro* à long terme et séquençage ARN de cellules individuelles.

L'ensemble des travaux présentés s'inscrit dans une stratégie de surveillance de la résistance aux antipaludiques au Cambodge et au Cameroun. Les études épidémiologiques des résistances décrites dans cette thèse permettront de mieux adapter les traitements antipaludiques pour limiter la sélection de parasites résistants dans ces deux pays. De nouvelles données concernant les mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance à l'artémisinine ont aussi été apportées. Parmi les nouvelles options thérapeutiques testées, certaines étaient efficaces sur les parasites multi-résistants, et pourraient remplacer les traitements de première ligne actuels en cas d'augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques au Cambodge.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, résistance, Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine, Cambodge, Cameroun, mécanisme, nouvelles options thérapeutiques.

ABSTRACT

Artemisinin-based Combination Therapies (ACT) are the standard treatments for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. ACTs are composed of two antimalarial molecules: a fast-acting artemisinin derivative, and a long-acting partner drug. The global use of this efficient formulation has enabled to reduce malaria-related mortality by sixty percent over the last 20 years.

After ACT introduction, many endemic countries moved into the elimination phase of the disease. However, parasite eradication is still being undermined by the emergence of parasite resistance to artemisinin and partner drugs. *Plasmodium falciparum* resistance issue is particularly present in Cambodia. The global spread of resistance to ACT would be a public health disaster. Therefore, new resistance control strategies have to be set up. Those strategies include: i) a performant diagnosis of resistance ii) the epidemiologic study of resistance iii) a better understanding of cellular mechanisms involved in resistance and finally iv) new therapeutic options discovery.

Previous studies have designed new phenotypic assays to detect resistance, which helped to discover molecular markers that are now used for global drug resistance surveillance. The first part of this work aimed, using those tools, to better define the epidemiology of ACT resistance in Asia and Africa focusing on two strategic countries: Cambodia, a low-transmission country, which is the epicentre of drug resistance emergence, and Cameroon, a high-transmission country where resistance to ACT has not yet been reported. The second part focused on testing of new antimalarial compounds, clinically and/or *in vitro*, on multi-resistant parasites collected in Cambodia. Finally, the last part explored the mechanism of artemisinin resistance using long term *in vitro* culture and Single Cell RNA sequencing.

The presented work is part of the global strategy for reduction of malaria prevalence. Through a better understanding of the epidemiology of resistant *P. falciparum* in Cambodia and Cameroon, this work helped to survey and adapt current treatments to avoid selection and spread of drug-resistant parasites. Moreover, new interesting data on artemisinin resistance mechanism were also generated. Among the new antimalarial compounds tested, some were efficient and could be considered as new therapeutic options to replace the current first-line treatment in Cambodia in case of increasing treatment failures.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, resistance, Artemisinin-based Combination Therapies, Cambodia, Cameroon, mechanism, new therapeutic options

REMERCIEMENTS

Un grand merci,

Aux docteurs **Léonardo BASCO** et **Pascal MILLET**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que pour votre présence dans le jury de soutenance de cette thèse.

Aux docteurs **Françoise BENOIT-VICAL**, **Jean-François Magnaval**, et **Jean-Christophe BARALE**, pour avoir accepté d'être membre du jury de soutenance de cette thèse.

À mon directeur de thèse **Antoine BERRY**, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur la résistance aux antipaludiques dans ton équipe en Master 2, et par la suite, pour m'avoir encouragée à poursuivre l'aventure au Cambodge. Merci pour ton soutien même à distance, aussi bien sur le plan scientifique qu'administratif.

À mon co-directeur de thèse **Benoit WITKOWSKI**, pour m'avoir accueillie dans ton équipe au Cambodge pendant plus de trois ans (quel meilleur endroit pour étudier les résistances), et pour la liberté de travail dont j'ai pu bénéficier. Merci de m'avoir transmis (non sans moqueries) tes connaissances. Enfin, merci pour tes très convaincantes imitations, qui m'ont valu de nombreux fou-rires.

À **Nicolas Blanchard** et son équipe pour votre accueil. Sandie, merci encore pour ton aide.

À l'équipe **MTRU** pour votre collaboration sur plusieurs des projets présentés. Merci notamment à **Selma**, pour ce que tu m'as appris pendant ton séjour, et pour ta bonne humeur.

À **Krystel** et **Sandrine**, c'était un plaisir de vous rencontrer et de travailler avec vous sur le projet **DHA-PPQ** au Cameroun. Krystel, je te souhaite bon courage pour ta thèse.

À **Anthony** et **Kaitlyn**, pour votre aide pour la manip de single cell, et les sorties hors travail.

À toutes les personnes dont j'ai croisé la route à l'**IPC**, et avec qui j'ai partagé de bons moments : **Béatrice** et **Daniel**, **Vinito** (even if you were scared of me !), ma première colloc **Monica**, **Axelle**, **David**, **Tim**, **Mirco**, **Mathieu**, **Hoa**, et tous les autres.

To **Cambodian people**, thank you for the unique and warm atmosphere that I found in your beautiful country (both literally and figuratively).

À tous les patients ayant participé aux études d'efficacité thérapeutique au Cambodge et au Cameroun, merci de nous avoir aidés à poursuivre nos recherches.

À toute l'unité Malaria de l'Institut Pasteur du Cambodge :

- Aux parasites, vous m'avez causé plus de peines que de joies, mais sans vous ce travail n'aurait pas été possible.

- To all my colleagues: it was a great pleasure to work with all of you, thank you for your help for the experiments, for your smile, and karaoke party ! I wish you and your family good luck for the future.

- À Amélie et Jean, un grand merci pour tous vos conseils, et bonne chance pour la suite.

- À Nimol Khim, pour l'énorme travail que tu as réalisé pour analyser les données de biomol, ainsi que pour tes conseils pour les manips. Merci aussi pour toutes nos discussions. Je te souhaite bonne chance pour la suite ainsi qu'à toute ta famille.

- To the culture team, Nimol Kloeung, Vatey, Ah Net, and Leang, special thanks to all of you for your hard work, without you a huge part of this thesis would not have been possible. I had a lot of fun with all of you. Leang, your energy was contagious to all of us. I wish you, and your family, all the best.

- À Julie, Camille et La Petite, pour les nombreux moments de rigolade, les recherches bizarres, les sorties, les voyages et les découvertes que j'ai pu faire avec vous. Camille, un grand merci pour ton aide pour les manips, ton soutien dans l'adversité, et tes conseils pour gérer les situations cocasses. Bonne chance à toutes pour la suite.

To the Selapak Team, Cindy, Lok Kru and all the CHAN family, Pu Long, Bora, Mr Thi and all the others... Thank you for your generosity and kindness, your help (so many times), and for all the good memories.

To Leak (and baby Nono), for your support, I am glad we have met.

À Sushi et Ralou, même à l'autre bout du monde, vous resterez le sang.

À toute ma famille. Gil, merci de m'avoir rendu visite. À mes grands-parents et mes parents, merci pour votre soutien et vos ondes positives. Maman, merci de m'avoir aidée à corriger les fautes !

SOMMAIRE

PARTIE 1 – Synthèse bibliographique.....	1
I. CHIMIOTHÉRAPIE ANTIPALUDIQUE	3
A. Historique de l'utilisation des principaux antipaludiques et des résistances associées.....	3
B. Les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine.....	9
II. RÉSISTANCES AUX COMPOSÉS ANTIPALUDIQUES.....	11
A. Émergence des résistances.....	12
B. Mécanismes de résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques.....	15
C. Les méthodes de surveillance de la résistance aux antipaludiques.....	28
III. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME ET DES RESISTANCES : EXEMPLES DU CAMBODGE ET DU CAMEROUN.....	32
A. Épidémiologie du paludisme.....	32
B. Bilan récent de la résistance aux CTA	37
IV. NOUVELLES OPTIONS THERAPEUTIQUES.....	41
A. Molécules à action rapide : les remplaçants de l'artémisinine.....	41
B. Molécules à action prolongée	42
C. Les triple-CTA.....	43
PARTIE 2 – Travaux de recherche.....	45
I. ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX CTA AU CAMBODGE ET AU CAMEROUN.....	46
A. Émergence de la résistance à l'artésunate-méfloquine en combinaison avec une faible dose de primaquine au Cambodge.....	46
B. Prévalence et phénotype des isolats triple-mutants cambodgiens.....	65
C. Efficacité de la DHA-PPQ pour les infections non compliquées à <i>P. falciparum</i> au Cameroun.....	87
II. NOUVELLES OPTIONS THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DU PALUDISME NON COMPLIQUÉ À <i>P. FALCIPARUM</i>.....	112

A. Efficacité de l'artésunate-pyronaridine associée à une dose unique de primaquine pour le traitement des infections non compliquées à <i>P. falciparum</i> au Cambodge.....	112
B. Action de la ferroquine <i>in vitro</i> sur des isolats multi-résistants collectés au Cambodge.....	139
C. Résistance clinique et <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> à l'artésunate-amodiaquine au Cambodge.....	146
III. ÉTUDE DU MÉCANISME DE RÉSISTANCE A L'ARTÉMISININE.....	181
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	197
RÉFÉRENCES.....	199

LISTE DES FIGURES

Partie 1

Figure 1 : Incidence du paludisme en 2018 (estimation du nombre de cas pour 1000 habitants)	1
Figure 2 : Chronologie de l'utilisation des principaux composés antipaludiques et émergence des résistances.....	3
Figure 3 : Propagation mondiale de la résistance à la chloroquine de 1957 à 2006.....	6
Figure 4 : Distribution de la résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, et artémisinine en Afrique et en Asie du Sud-Est.....	8
Figure 5 : Résistance aux CTA (échecs au traitement >10%) dans la région du Grand Mékong.....	11
Figure 6 : Cycle de vie parasitaire de <i>Plasmodium</i> , précisant le nombre de parasites (encadré en vert) et le nombre approximatif de répliquations de l'ADN (en noir) à chaque stade.....	12
Figure 7 : Ratio de mutations non synonymes par rapport aux synonymes chez <i>P. falciparum</i> dans 22 pays.....	13
Figure 8 : Activité des principales molécules antipaludiques sur les différents stades du cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	16
Figure 9 : Molécules antipaludiques, leurs principales cibles biologiques, et mécanismes de résistance associés.....	18
Figure 10 : Schématisation du délai de clairance parasitaire entre une souche sensible et une souche résistante à l'ART.....	19
Figure 11 : Carte des différents polymorphismes du gène <i>K13</i> associés à la résistance à l'ART en Asie du Sud Est.....	24
Figure 12 : Protocole du RSA <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	30
Figure 13 : Incidence de <i>P. falciparum</i> au Cambodge en 2017 (nombre de cas pour 1000 habitants)..	32
Figure 14 : Estimation moyenne du nombre de cas et de décès liés au paludisme de 2010 à 2018 au Cambodge, <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> confondus.....	33
Figure 15 : A. Carte du Cameroun indiquant les différents climats par région. B. Incidence et prévalence de <i>P. falciparum</i> au Cameroun en 2017.	35
Figure 16 : Evolution du nombre moyen de cas et décès liés à <i>P. falciparum</i> de 2010 à 2018 au Cameroun.....	36

Figure 17 : Molécules antipaludiques dont le développement est soutenu par MMV.....44

Partie 2

Figure 18 : Carte du Cambodge indiquant les provinces incluses dans les études cliniques, moléculaires et *in vitro*.....49

Figure 19 : Efficacité clinique de l'AS-MQ de 2016 à 2019.....52

Figure 20 : Évolution des principaux marqueurs moléculaires de résistance de 2016 à 2019 à l'Est et à l'Ouest du Cambodge (voir carte dans la partie méthodes).....54

Figure 21 : Evolution des principaux polymorphismes du gène *Pfcr*t entre 2016 et 2017 au Cambodge.....56

Figure 22 : Evolution de la susceptibilité à la PPQ (gauche) et à la MQ (droite) des isolats collectés entre 2016 et 2019.....57

Figure 23 : Impact des différents génotypes de résistance sur la susceptibilité des isolats cambodgiens.....59

Figure 24 : A. Impact des mutations dans K13 et du nombre de copies des gènes *Pm2* et *Mdr1* sur la susceptibilité à la MQ et à la PPQ. B. Impact de l'amplification du gène *Mdr1* sur l'efficacité clinique de l'AS-MQ.....60-61

Figure 25 : Impact des polymorphismes du gène *Crt* sur la susceptibilité à la PPQ et MQ *in vitro*.....61

Figure 26 : Complément de la figure 4 de l'article – ajout de la courbe d'inhibition de la double combinaison de MQ/PPQ d'un isolat cambodgien *K13-C580Y/Mdr1*-amplifié (courbe bleue).....68

Figure 27 : Evolution de la susceptibilité des isolats *K13*-sauvages collectés au Cambodge de 2012 à 2019.....187

Figure 28 : Evolution de la susceptibilité de l'isolat INITIAL à l'ART pendant la dérive en culture.....188

Figure 29 : Souche PRESSION après enrichissement à la SLO.....189

Figure 30 : Susceptibilité des parasites à la DHA après enrichissement, évaluée par RSA^{0-3h}190

Figure 31: A. Visualisation par réduction dimensionnelle des différents groupes de parasites des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION après 6 heures de traitement au DMSO ou DHA – données préliminaires. B. Expression relative de chaque groupe (en nombre et proportion de parasites).....192

LISTE DES TABLEAUX

Partie 1

Tableau 1 : Principaux marqueurs moléculaires associés à la résistance aux antipaludiques.....31

Tableau 2 : Prévalence des principales mutations associées à la résistance aux molécules antipaludiques ces dernières années au Cameroun.....39

Partie 2

Tableau 3 : Descriptif des études cliniques, moléculaires et phénotypiques effectuées au Cambodge entre 2016 et 2019.....48

Tableau 4 : Efficacité thérapeutique de l'AS-MQ entre 2017 et 2019 au Cambodge.....52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACPR	Adequate clinical and parasitological response (réponse clinique et parasitologique adéquate)	K13	Kelch13
		LDH	Lactate déshydrogénase
		LM	Luméfantrine
ADN	Acide désoxyribonucléique	MAD	Déviatation absolue de la médiane
AL	Artéméther-luméfantrine	MDR	Multi-drug resistance
AM	Artéméther	MQ	Méfloquine
AQ	Amodiaquine	MR4	Malaria Research and Reference Reagent Resource
AQSA	Amodiaquine survival assay		
ARN	Acide ribonucléique	OMS	Organisation mondiale de la santé
ART	Artémisinine		
AS	Astésunate	PCA	Principal component analysis
ASAQ	Artésunate-amodiaquine	PCR	Polymerase chain reaction
ATQ	Atovaquone	<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50%	P.I.	Post invasion
BSA	Bovine Serum Albumin	PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
BTB	Broad-complex /tramtrack/bric à brac	PM2/3	Plasmepsin2/Plasmepsin3
		PPQ	Pipéraquine
CNM	Centre National de Malariologie	PQ	Primaquine
		PSA	Piperaquine survival assay
CQ	Chloroquine	PYR	Pyronaridine
CRT	Choroquine resistance transporter	QN	Quinine
		RPMI	Roswell Park Memorial Institute
CTA	Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine		
		RSA	Ring-stage survival assay
DHA	Dihydroartémisinine	SEM	Standard error of the mean
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	SLO	Streptolysine O
GEMs	Gel Beads-in-emulsion	SNN	Shared nearest neighbor
GO	Gene ontology	SP	Sulfadoxine-pyriméthamine
HRP2	Histidine rich protein-2		
HVF	Highly Variable Factors	TWAS	Transcriptome-wide association studies
IQR	Interquartile range		

UMI	Identifiant moléculaire unique	UPR	Unfolded Protein Response
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection	WT	Wild type
		WWARN	Worldwide antimalarial resistance network

PARTIE 1:

Synthèse bibliographique

Le paludisme est une parasitose tropicale associée à une mortalité et une morbidité importante. Cette maladie est présente surtout dans les pays du Sud (figure 1). Sa prévalence, estimée à 228 millions de cas en 2018, a été associée à près de 405000 décès dont plus de 90% en Afrique subsaharienne (1). Les enfants de moins de cinq ans qui n'ont pas encore développé de réponse immunitaire contre le parasite ainsi que les femmes enceintes sont tout particulièrement à risque (65% des décès).

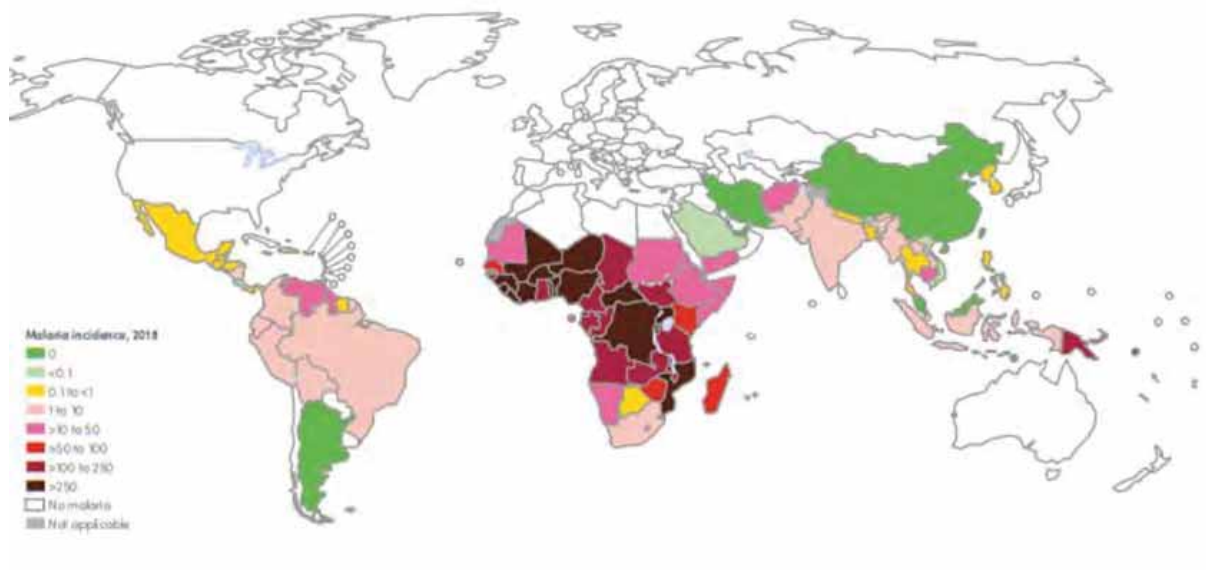


Figure 1 : Incidence du paludisme en 2018 (estimation du nombre de cas pour 1000 habitants).
(Organisation mondiale de la santé - World Malaria Report 2019)

L'agent pathogène est un hématozoaire Apicomplexa du genre *Plasmodium*. Parmi les cinq espèces du genre *Plasmodium* capables d'infecter l'Homme, *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée, impliquée dans la grande majorité des décès, et la plus associée aux problématiques de chimiorésistance.

Les symptômes causés par *P. falciparum* sont aspécifiques, se manifestant en général par de la fièvre, des céphalées, et des troubles gastro-intestinaux. L'infection peut être simple, ou évoluer en paludisme compliqué. L'accès compliqué est souvent fatal chez les patients non immuns, et associé à une atteinte cérébrale, une dysfonction respiratoire ou rénale, ou encore une anémie sévère (2).

Plasmodium est transmis d'un individu à l'autre via un repas sanguin de moustique du genre *Anopheles*. La répartition de *P. falciparum* et le nombre de piqûres infectantes par jour et par personne varie d'une région à l'autre : certaines zones notamment en Afrique subsaharienne sont des zones de

très forte transmission, qui concentrent plus de 90% des cas à l'échelle globale, tandis que l'Asie et l'Amérique du Sud sont des zones de moyenne à faible transmission (figure 1, (1)). La forte mortalité liée au paludisme en Afrique subsaharienne s'explique entre autre par un manque notable d'accès au diagnostic, aux traitements et aux stratégies d'élimination vectorielle dans les zones reculées.

Le poids sanitaire important du paludisme a été un levier pour la mise en place du plan global d'élimination déployé ces vingt dernières années dans les pays endémiques. Les principaux axes mis en œuvre ont été :

- L'amélioration de la lutte anti-vectorielle grâce à l'utilisation d'insecticides (pulvérisation intra-domiciliaire, larvicides) et à la généralisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide ;
- Un renforcement des capacités diagnostiques surtout via l'introduction de tests rapides et la formation de microscopistes ;
- La mise en place de traitements antipaludiques efficaces représentés par la famille des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), et le déploiement de stratégies préventives (traitement préventif intermittent, et chimio-prévention saisonnière) ;
- Une meilleure accessibilité aux structures de soin.

Ces initiatives ont permis de réduire l'incidence globale du paludisme de 37% et la mortalité de 60% entre 2000 et 2015 (3,4). Dans certaines localités, le paludisme a également pu être éliminé comme au Sri Lanka ou encore dans les provinces du Yunnan et du Hainan en Chine (5). Outre l'accès au soin et la lutte anti-vectorielle, la mise en place des CTA a constitué un élément décisif pour cette avancée. Néanmoins, l'élimination est encore loin d'être atteinte au niveau mondial.

La récente émergence de résistances aux CTA de première ligne utilisées en Asie du Sud-Est constitue un frein important à l'élimination du paludisme dans cette région. Les CTA demeurent pour l'instant efficaces en Afrique, mais l'apparition de résistances aurait des conséquences sanitaires inquiétantes. L'étude des résistances aux différents traitements antipaludiques représente donc un enjeu majeur pour la lutte contre le paludisme.

I. CHIMIOTHÉRAPIE ANTIPALUDIQUE

A. Historique de l'utilisation des principaux antipaludiques et des résistances associées

Au cours du siècle dernier, la recherche de molécules actives contre *Plasmodium* a été très active (figure 2) (6). Dans le contexte actuel de chimiorésistance, cet axe de recherche demeure encore une priorité. Pour presque toutes les alternatives thérapeutiques proposées, l'émergence de parasites résistants a pu être observée, soulignant la nécessité quasi constante de faire évoluer l'arsenal thérapeutique. La majorité des molécules antipaludiques en usage sont dérivées de substances naturelles.

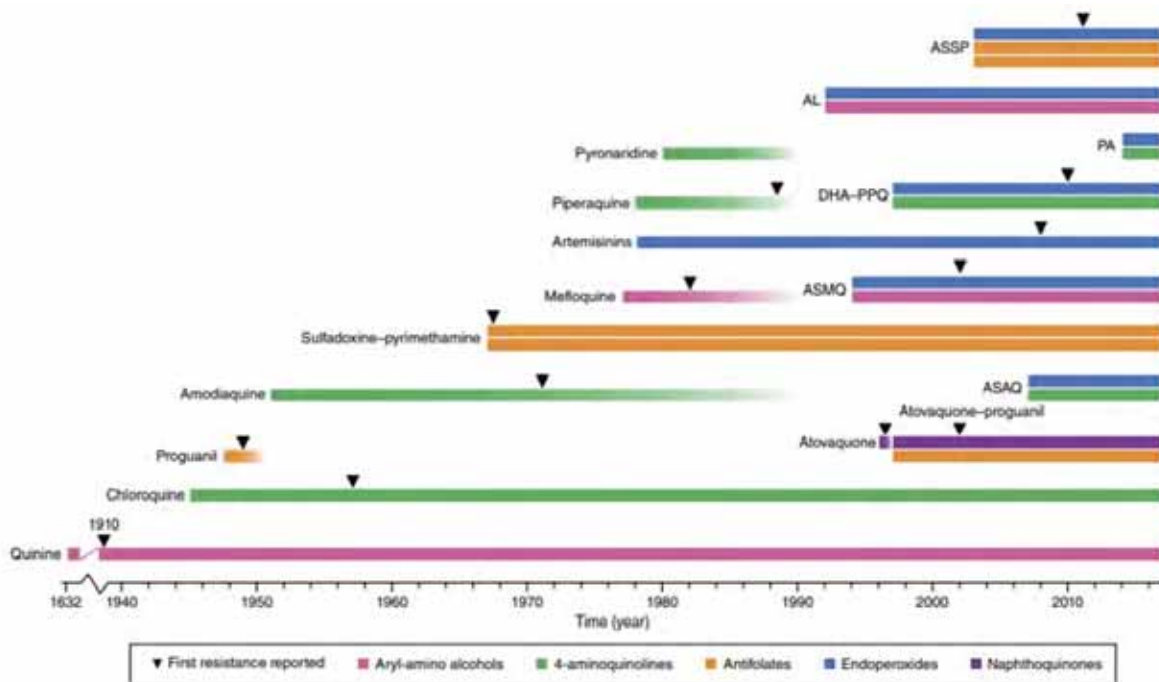


Figure 2 : Chronologie de l'utilisation des principaux composés antipaludiques et émergence des résistances (Blasco *et al.* 2017)

1. La quinine

La quinine (QN) a été isolée en 1820 à partir de l'écorce de quinquina, dont les décoctions étaient déjà utilisées depuis plusieurs siècles pour le traitement des fièvres en Amérique du Sud (7). C'est le premier antipaludique à avoir été largement utilisé. La QN appartient au groupe des aryl-amino alcool ; c'est l'alcaloïde de l'écorce de quinquina le plus actif contre *Plasmodium*. La quinine purifiée

a été utilisée comme traitement antipaludique de référence jusqu'aux années 1940, période durant laquelle elle fut remplacée par des molécules plus efficaces comme la chloroquine (CQ) (8). Cette molécule a depuis été utilisée comme traitement de deuxième ligne, principalement chez les femmes enceintes lors du premier trimestre de grossesse ainsi que pour certains cas de paludisme sévère (9). Plusieurs études ont cependant démontré que les CTA au premier mois de grossesse et l'injection d'artésunate (AS) pour les cas de paludismes sévères étaient plus efficaces que la QN et causaient moins d'effets indésirables (10,11). Le premier cas de résistance à la QN a été rapporté en 1908 (12). L'apparition de la résistance à la QN s'est faite lentement. Malgré une diminution de la sensibilité de *P. falciparum* à la QN en Asie et en Amérique du Sud, la molécule semble conserver son efficacité (9).

2. Les dérivés de la quinine

Plusieurs aryl-amino alcools dérivés de la QN ont par la suite été synthétisés. Parmi eux, la méfloquine et la luméfántrine sont les molécules les plus utilisées.

- *La méfloquine (MQ)* : elle est issue d'une longue liste de composés antipaludiques développés par l'armée américaine (Experimental Therapeutics Division of the Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)) à la fin de la guerre du Vietnam, en réponse au lourd bilan de mortalité des soldats américains liée au paludisme résistant à la CQ (13). L'usage de la MQ, alors devenue la principale prophylaxie des soldats américains et des touristes en zones endémiques, a rapidement été controversé au milieu des années 1990 après plusieurs études cliniques reportant des effets secondaires cardiologiques et neuropsychiatriques chez l'homme (13). La neuro-toxicité de la MQ a par la suite été confirmée grâce au modèle murin (13,14). La MQ est aujourd'hui utilisée comme prophylaxie antipaludique du voyageur, et comme drogue partenaire (en raison d'une longue demi-vie d'environ 3 semaines) en combinaison avec l'AS (AS-MQ) notamment en Asie du Sud-est. Le premier cas de résistance à la MQ a été rapporté en 1982 en Thaïlande (15).

- *La luméfántrine (LM)* : cette molécule a été découverte à la fin des années 1960 pendant le projet chinois 523 visant à identifier de nouvelles molécules antipaludiques à partir de remèdes

traditionnels chinois. Ce projet a aussi mené à la découverte de l'artémisinine (ART), de la pipéraquline (PPQ) et de la pyronaridine (PYR) (16). Ce projet, initié par le gouvernement chinois pendant la révolution culturelle, était avant tout un projet militaire visant à trouver un traitement efficace contre le paludisme résistant à la CQ qui touchait les soldats nord-vietnamiens pendant la guerre du Vietnam. Un seul rapport fait mention de l'utilisation de la LM en monothérapie en Chine (17), et ce n'est qu'à partir de l'introduction des CTA que la LM a été utilisée comme drogue partenaire en combinaison avec l'artemether (AL). La demi-vie de la LM est de 3 à 5 jours (18). La résistance à la LM n'a pas été clairement démontrée, mais une tolérance augmentée à la molécule a été observée chez des souches parasitaires africaines présentant un profil de sensibilité à la CQ (19–21).

3. La chloroquine

La CQ a été découverte en 1934 par des scientifiques Allemands. Ces recherches sont restées en suspens pendant une décennie avant d'être reprises par des chercheurs Américains pendant la Deuxième Guerre mondiale. Une alternative à la QN était en effet urgente à cette période, le Japon ayant pris le contrôle du principal site de production de quinquina, en Indonésie (22).

La CQ appartient au groupe des amino-4-quinoléines (23). Grâce à son efficacité à la fois contre *P. falciparum* et *P. vivax* ainsi qu'à sa faible toxicité, la CQ est rapidement devenue l'antipaludique le plus utilisé après la deuxième guerre mondiale. En 1957, les premières études mentionnant l'émergence de la résistance à la CQ à la frontière Thaïlande-Cambodge ont été publiées (24). La résistance à la CQ s'est par la suite propagée à l'Ouest de l'Asie et à l'Afrique, mais a aussi émergé de façon indépendante dans d'autres continents, notamment au Venezuela et en Colombie dans les années 1960, et en Papouasie Nouvelle Guinée au milieu des années 1970 (figure 3) (23,25). La diffusion de la résistance à la CQ a causé une importante augmentation de la prévalence et de la mortalité liée à *P. falciparum* en Afrique pendant les années 1980.

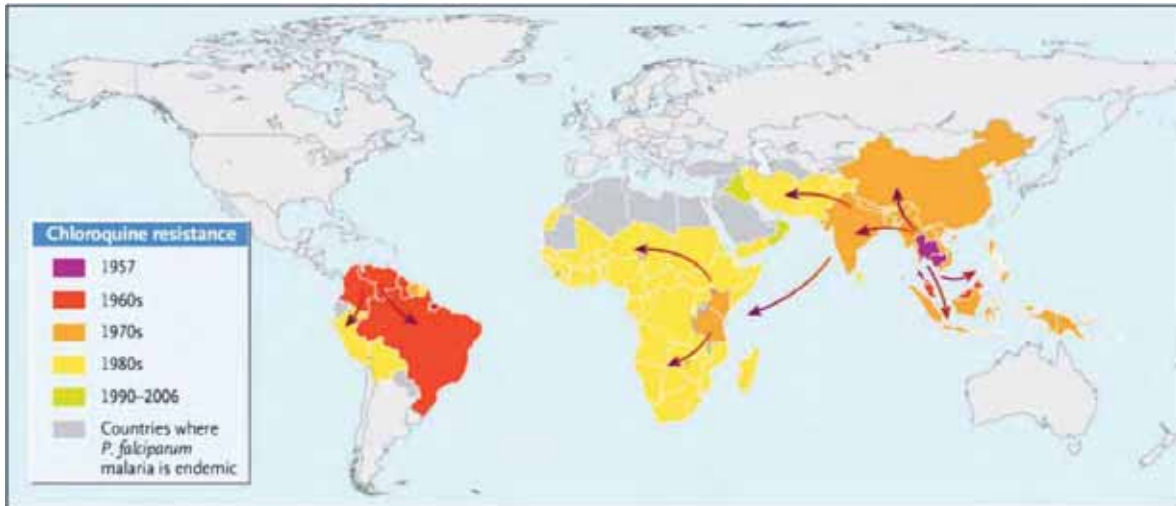


Figure 3 : Propagation mondiale de la résistance à la chloroquine de 1957 à 2006.
(Packard *et al.* 2014)

4. Les dérivés de la chloroquine

Plusieurs approches ont été utilisées afin de développer des antipaludiques efficaces contre les parasites résistants à la CQ. De ces modifications a découlé la synthèse de nombreuses molécules dérivées ayant des propriétés et un mode d'action similaires à ceux de la CQ. Parmi elles, on retrouve entre autres :

- *La pipéraquline (PPQ)* : elle a été découverte en Chine et en France indépendamment dans les années 1960. La PPQ a dans un premier temps été testée en Chine et en Afrique, puis a été massivement utilisée en Chine contre les souches résistantes à la CQ (26). Les premières souches résistantes à la PPQ ont été identifiées en Chine en 1989, lors d'essais cliniques conduits dans l'île de Hainan (27). La résistance à la PPQ a plus tard été confirmée en Chine par plusieurs autres études (28,29). La PPQ est officiellement utilisée comme drogue partenaire en combinaison avec la dihydroartémisinine (DHA) depuis 2010 en Asie et en Afrique, sa demi-vie étant d'environ 20 jours.
- *L'amodiaquine (AQ)* : découverte en 1948 (30), elle est aujourd'hui utilisée principalement en Afrique en combinaison avec l'AS (ASAQ). Le métabolite actif de l'AQ, la mono-déséthyl-amodiaquine (MDAQ), a une demi-vie d'une à trois semaines (31). La résistance à l'AQ a rapidement émergé dans

les années 1970. Plusieurs études *in vitro* et cliniques ont démontré la résistance croisée entre la CQ et l'AQ, ayant vraisemblablement accéléré l'émergence de la résistance à l'AQ (32–34).

5. Les antifolates

Les antifolates sont des inhibiteurs de la voie de synthèse des folates, impliqués notamment dans la composition des acides nucléiques. Les principaux antifolates (le proguanil, la sulfadoxine et la pyriméthamine), ont été synthétisés dans les années 1940 (35). Le proguanil et la pyriméthamine appartiennent aux antifolates de classe I (inhibiteurs de la dihydrofolate reductase (DHFR)). La sulfadoxine appartient à la famille des antifolates de classe II (inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase (DHPS)). L'inhibition simultanée de ces deux enzymes ayant une action synergique sur le parasite, l'utilisation combinée des antifolates de classe I et II a rapidement été adoptée pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* (35). La combinaison la plus connue est la sulfadoxine-pyriméthamine (SP). La SP a été introduite dans les années 1990 en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud et en Afrique suite à la multiplication de souches résistantes à la CQ. La résistance à la SP a émergé et a diffusé très rapidement dans ces trois régions, en moins de cinq ans après son introduction (figure 4) (36). En Afrique, cette combinaison est encore largement utilisée pour le traitement préventif des femmes enceintes et des jeunes enfants, en raison de sa sûreté et d'un moindre coût de fabrication. Le proguanil est en revanche principalement utilisé en combinaison avec l'atovaquone pour le traitement préventif du paludisme, notamment chez les voyageurs.

6. L'atovaquone

L'atovaquone (ATQ) appartient à la famille des naphtoquinones, synthétisés pendant la Deuxième Guerre mondiale en réponse à l'épuisement du stock de quinine. Cette molécule a fréquemment été utilisée en combinaison avec d'autres agents antipaludiques. L'ATQ-proguanil (Malarone), est la combinaison de première ligne utilisée pour la chimioprophylaxie du voyageur (37) et reste toujours efficace, malgré l'existence de résistances à l'ATQ et au proguanil (38).

7. L'artémisinine et ses dérivés

L'ART a été isolée en 1979 à partir d'une plante, *Artemisia annua*, utilisée comme remède ancestral chinois pour le traitement des fièvres (39). Les propriétés antipaludiques de cette plante ont été découvertes par la professeure chinoise TU Youyou et son équipe, lors du projet 523 décrit précédemment dans la partie LM (16). L'ART est un sesquiterpène lactone de la famille des endopéroxydes. Sa composition chimique unique en fait l'antipaludique majeur découvert le siècle dernier. Plusieurs dérivés semi-synthétiques et synthétiques ont par la suite été développés (DHA, artéméther (AM), artésunate (AS), ozonides (OZ)) (40). Les dérivés de l'ART sont maintenant recommandés comme traitement de première ligne pour le traitement des formes non compliquées et sévères du paludisme à l'échelle globale (1,3,4,41), en combinaison avec une drogue partenaire pour limiter l'apparition de résistances. La demi-vie de l'artémisinine est d'environ une heure. De ce fait, les parasites asexués ne sont exposés que brièvement à des doses résiduelles d'artémisinine dans le sang, limitant en théorie la sélection de parasites résistants (42). L'ART présente aussi une activité gamétocyticide. En dépit de la courte demi-vie de l'ART, de son effet bloquant sur la transmission, et des mesures prises pour éviter d'utiliser la molécule en monothérapie, les premières souches résistantes à l'ART ont été identifiées en 2006 à l'Ouest du Cambodge (43). La résistance s'est depuis propagée à toute la région du Grand Mékong, mais visiblement pas encore en Afrique (figure 4) (44,45).

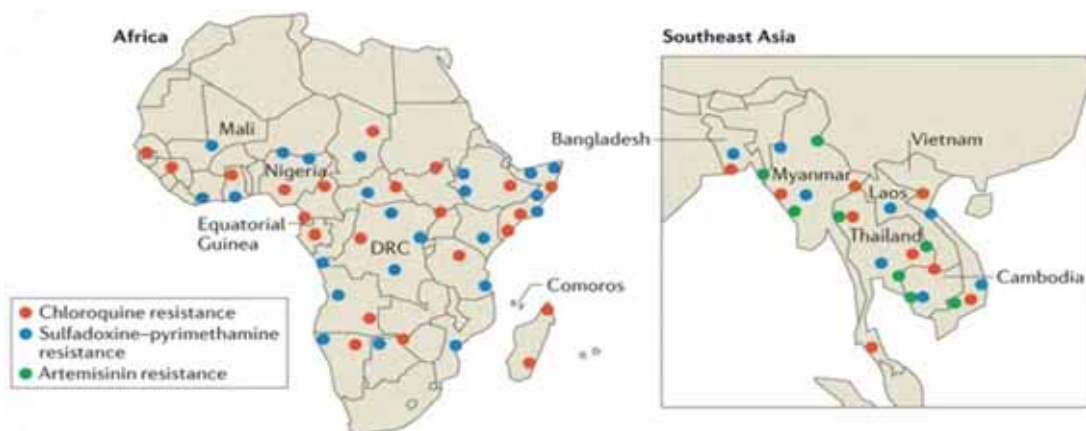


Figure 4 : Distribution de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, et artémisinine en Afrique et en Asie du Sud-Est.

(Haldar *et al.* 2018)

8. La primaquine

La primaquine (PQ) a été synthétisée en 1946 aux États-Unis (46). Elle fait partie de la famille des amino-8-quinoléines. C'est l'une des seules molécules antipaludiques à pouvoir bloquer la transmission des 5 espèces de *Plasmodium* infectant l'homme, grâce à son activité contre les gamétocytes (47). La PQ était principalement utilisée pour traiter les infections à *P. vivax* et *P. ovale* grâce à son action sur les hypnozoïtes. Son utilisation pour le traitement de *P. falciparum* était limitée en raison des effets secondaires sévères qui y sont associés, notamment chez les personnes présentant une déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) dont la fréquence est importante chez les populations africaines et asiatiques (48). L'utilisation de la PQ à faible dose en combinaison avec une CTA a récemment été inscrite dans les recommandations de l'OMS pour le traitement de *P. falciparum* en zone de faible transmission, et a prouvé son efficacité et sa sûreté dans des régions où la prévalence de la déficience en G6PD est élevée (53–56). La résistance de *P. falciparum* à la PQ n'a jamais été observée.

B. Les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

L'OMS recommande l'utilisation des CTA pour le traitement des formes non compliquées de paludisme à *P. falciparum* des enfants et des adultes (à l'exception des femmes enceintes pendant le premier trimestre de grossesse) (49). Les CTA ont été développées dans le but de limiter l'émergence des résistances, favorisée par l'utilisation d'antipaludiques en monothérapie. Leur implémentation au début du XXI^{ème} siècle a permis de réduire drastiquement la prévalence et la mortalité liée au paludisme (3). Les CTA sont composées d'une molécule dérivée de l'ART de courte demi-vie à action rapide, associée à une molécule partenaire de longue demi-vie à action plus lente. La durée recommandée du traitement est de trois jours. Cinq CTA sont aujourd'hui enregistrés par l'OMS pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* :

- *L'artéméther-luméfantrine (AL)* : cette combinaison est la plus utilisée mondialement, et son efficacité a été prouvée dans tous les pays testés. La résistance à l'AL n'a jamais été clairement observée, mais les parasites présentant un profil de sensibilité à la CQ (allèles 86N-184F-1246D du gène *Mdr1*) ont été associés aux échecs thérapeutiques de l'AL en Afrique (50,51) ;
- *L'artésunate-amodiaquine (ASAQ)* : cette combinaison est principalement utilisée en Afrique. Certaines études ont rapporté une efficacité de l'ASAQ inférieure à 90%, notamment au Rwanda et Myanmar, en lien avec la présence préalable de la résistance à l'AQ dans ces pays (52–54). L'efficacité de l'ASAQ en Asie du Sud Est est mal connue et a été étudiée au Cambodge dans la partie travaux de recherche ;
- *La dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA-PPQ)* : surtout utilisée en Asie du Sud-Est de 2000 à 2015, cette combinaison est de plus en plus testée en Afrique (55–58). La résistance à la DHA-PPQ a émergé cette dernière décennie au Cambodge (59), et s'est propagée en Asie du Sud-Est (60–65) ;
- *L'artésunate-méfloquine (AS-MQ)* : cette combinaison est surtout utilisée en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud (66). Elle est encore peu utilisée en Afrique malgré une efficacité similaire à celle de l'AL (67). La résistance à l'AS-MQ a émergé dans les années 2000 au Cambodge et à la frontière Thaïlande-Myanmar (59,68–70) ;
- *Artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASP)* : c'est la CTA la moins utilisée. L'ASP est le traitement de première ligne en Inde (1). Cette combinaison est aussi utilisée en Afrique, mais a été montrée moins efficace que l'AL (71).

La résistance aux CTA pose aujourd'hui problème dans la région du Grand Mékong. Le Cambodge est l'épicentre de l'émergence des résistances, avec quatre CTA présentant une efficacité thérapeutique insuffisante: l'AS-MQ, la DHA-PPQ, l'AL et l'ASAQ (figure 5) (72). Dans le cas de l'AL, les échecs cliniques n'ont pas été associés à la résistance à la LM (données non publiées).

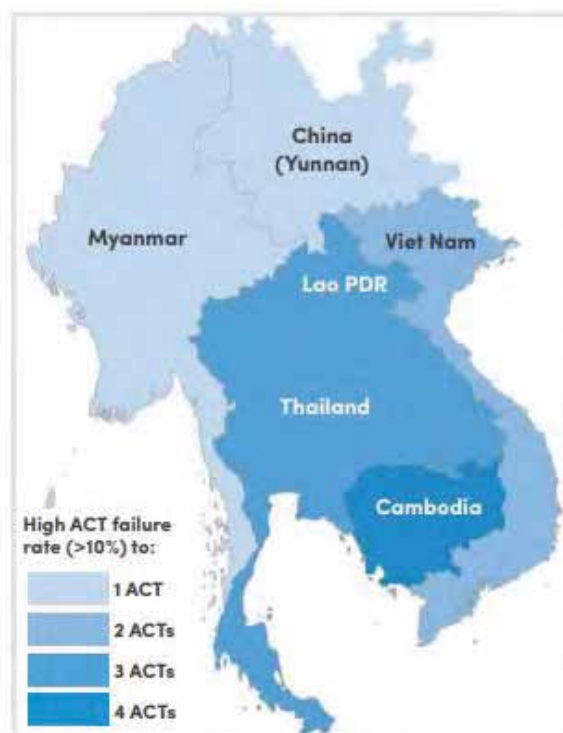


Figure 5 : Résistance aux CTA (échecs au traitement >10%) dans la région du Grand Mékong. (OMS, Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy, 2018)

II. RÉSISTANCES AUX COMPOSÉS ANTIPALUDIQUES

La résistance antimicrobienne est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant « la capacité d'un microorganisme (bactéries, virus, et certains parasites) à contrecarrer l'effet d'un traitement antimicrobien (antibiotiques, antiviraux, antiparasitaires) dirigé contre lui. Par conséquent, les traitements standards deviennent inefficaces, les infections persistent et les microorganismes résistants se propagent dans la population » (73).

En l'absence d'un vaccin efficace, la lutte contre le paludisme est supportée par la chimiothérapie et les stratégies anti-vectorielles (74,75). Depuis les années 1950, des résistances aux principales molécules antipaludiques ont émergé et se sont propagées. La région du Grand Mékong fait face depuis près de vingt ans à l'émergence de résistances aux CTA. L'étude des résistances en terme d'évolution, de mécanismes et de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu majeur pour l'élimination du paludisme, visée par l'OMS pour 2030.

A. Émergence des résistances

1. Apparition d'un événement génétique aléatoire au sein du génome

La résistance de *Plasmodium* apparaît suite à un événement stochastique au sein du génome du parasite (mutation ou augmentation du nombre de copies d'un gène) qui est indépendant de l'exposition aux molécules antipaludiques (76). Ces événements peuvent se produire à tout moment du cycle de vie du parasite où l'ADN est répliqué : au sein du moustique où se produit la méiose, lors du développement pré-érythrocytaire dans le foie, ou bien lors du stade sanguin (Figure 6) (77–79).

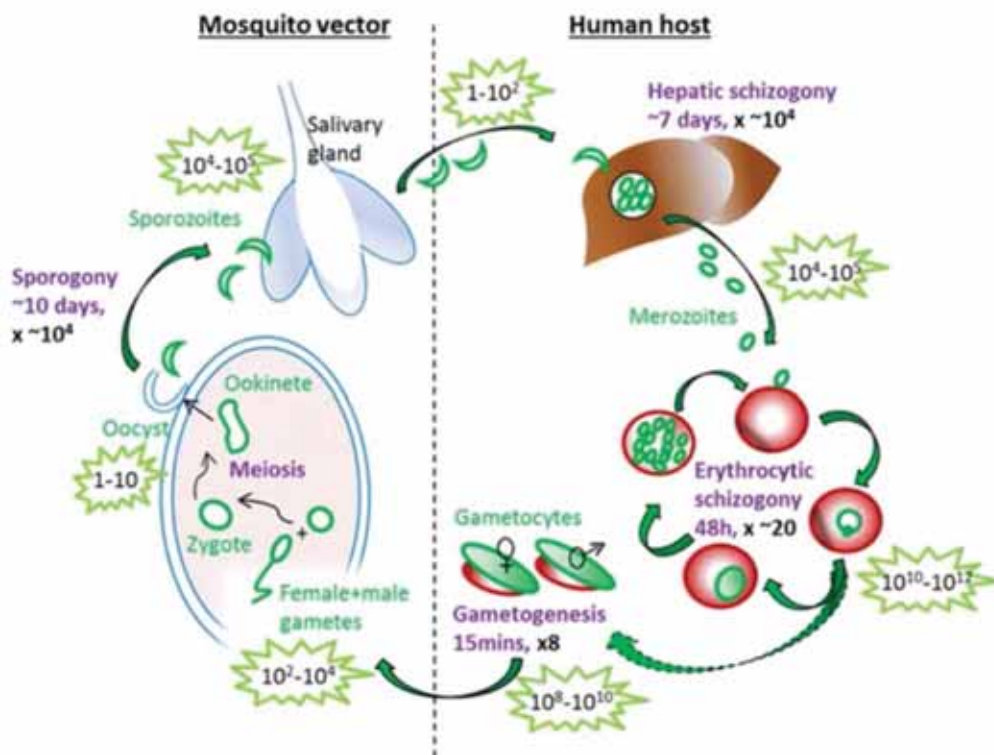


Figure 6 : Cycle de vie parasitaire de *Plasmodium*, précisant le nombre de parasites (encadré en vert) et le nombre approximatif de réplifications de l'ADN (en noir) à chaque stade.

(Matthews *et al.* 2018)

L'apparition de la résistance peut nécessiter une combinaison de plusieurs événements génétiques. La probabilité qu'un événement se produise est augmentée par le grand nombre de divisions cellulaires que subit l'ADN du parasite au cours de son cycle (figure 6). Par ailleurs, un événement unique aura statistiquement plus de chance d'apparaître (et d'être sélectionné) qu'une combinaison d'événements (76).

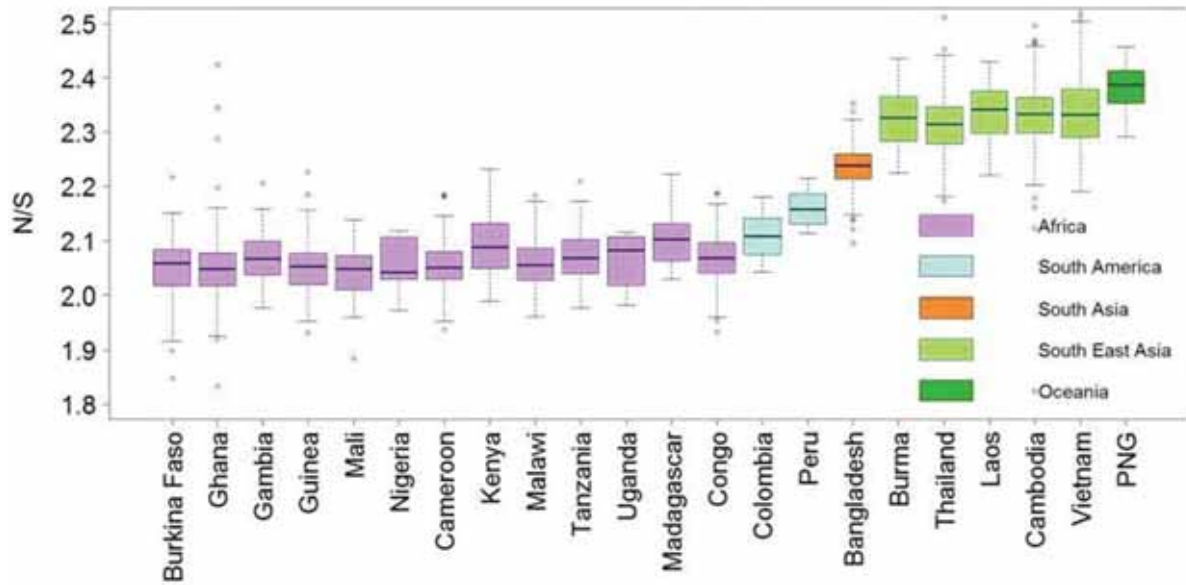


Figure 7 : Ratio de mutations non synonymes par rapport aux synonymes chez *P. falciparum* dans 22 pays. (PNG=Papouasie Nouvelle Guinée) (Singh *et al.* 2016)

La grande plasticité génétique des parasites originaires d'Asie du Sud-Est a d'abord été attribuée à un taux important de mutations non-synonymes, leur conférant une meilleure capacité à développer des traits génétiques permettant de résister aux antipaludiques (figure 7) (80,81). Cependant, il a récemment été démontré que les parasites du Cambodge présentaient un taux de mutations dit « intermédiaire », touchant principalement des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, en opposition avec l'hyper-mutabilité précédemment décrite (82). Quelles qu'en soient les modalités, *Plasmodium* remodèle donc sans cesse son ADN, en quête de survie et de multiplication. Une fois apparues au sein du génome, les modifications génétiques peuvent disparaître ou être maintenues si elles confèrent un avantage évolutif.

2. Sélection des parasites résistants

La sélection de la résistance dépend surtout du nombre de parasites exposés à une molécule antipaludique. Au cours du cycle de *Plasmodium*, entre 100000 et 300000 mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine, et donc potentiellement exposés aux antipaludiques circulants. Ce grand nombre facilite la sélection de parasites résistants, et entraîne la contre-sélection des parasites sensibles (76).

Il a été démontré que l'hyper-parasitémie chez un patient augmente la probabilité de sélectionner des parasites résistants (42). Une personne infectée déclarant des symptômes présente la plupart du temps une parasitémie élevée, son système immunitaire n'ayant pas été en mesure de contrôler la multiplication du parasite.

Par conséquent, la sélection de parasites résistants dépend du système immunitaire de l'hôte. Dans les zones de faible transmission de *Plasmodium*, les patients présentent plus souvent des infections symptomatiques. De ce fait, les patients sont plus régulièrement traités et les parasites, plus en contact avec les molécules antipaludiques, deviennent plus rapidement résistants. C'est l'une des raisons pour laquelle les résistances aux antipaludiques (CQ, MQ, PPQ, ART...) ont émergé en Asie du Sud-Est (83). Dans les zones de forte transmission, la plupart des individus sont partiellement immuns. La probabilité de rencontre entre un nombre important de parasites avec un composé antipaludique est donc restreinte aux jeunes patients non immuns. Les chances de sélection des parasites résistants sont par conséquent réduites.

L'utilisation de traitements contrefaits, ou le mauvais suivi du traitement conduisent à la persistance de doses résiduelles d'antipaludiques dans le sang, favorisant la sélection de parasites résistants (42).

3. Transmission et propagation des résistances

La transmission du parasite commence au stade gamétoocyte, stade précurseur de la reproduction sexuée. La probabilité de transmission des parasites au moustique augmente avec le nombre de gamétoocytes produits chez l'hôte infecté. Il a été montré que la production de gamétoocytes par les souches résistantes après traitement était souvent plus importante que celle des souches sensibles (84). Cela s'explique par le délai de clairance observé lors d'un échec parasitologique, donnant plus de temps aux parasites asexués d'entamer la gamétocytogénèse. La très large et rapide diffusion de la résistance à la SP a par exemple été facilitée par un le portage gamétocytaire important des patients après traitement avec cette molécule (85). Une meilleure transmission des parasites résistants à la SP après traitement a aussi été démontrée dans un modèle murin (86).

La résistance peut en revanche présenter un coût biologique et donc un désavantage dans la transmission du parasite. Goodman *et al.* ont démontré une mise en échec de la transmission des parasites résistants à l'ATQ dans un modèle murin (87). Les parasites résistants présentaient en effet une altération de leur activité mitochondriale, qui empêcherait la reproduction des gamétocytes femelles.

L'implication du vecteur dans la diffusion des résistances est mal connue. Les vecteurs ont une capacité de diffusion restreinte du fait d'un périmètre de vol limité à seulement quelques kilomètres (88). La propagation de la résistance à grande échelle s'explique par conséquent par les flux migratoires humains. Le flux de travailleurs migrants de l'Inde à l'Afrique de l'Est est très probablement à l'origine de la diffusion de la résistance à la CQ en Afrique (89,90). De même, la récente propagation de la résistance à la DHA-PPQ dans la région du Grand Mékong impliquerait des souches de même fond génétique ayant émergé à l'Ouest du Cambodge et qui se seraient propagées à l'Est du Cambodge, en Thaïlande et au Vietnam (91,92). L'apparition de résistances peut cependant avoir plusieurs origines indépendantes, comme cela a été montré pour la résistance à l'ART en Asie du Sud Est (92,93), ou pour l'émergence de résistance à la CQ en Amérique du Sud (89).

B. Mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

1. Principales cibles des antipaludiques

Les antipaludiques peuvent cibler le stade hépatique, sanguin ou sexué du parasite (figure 8) (94,95). La grande majorité des antipaludiques ayant été développés dans l'optique de réduire les symptômes de la maladie, la plupart d'entre eux agissent sur le stade sanguin asexué (figure 8). Par conséquent, la majorité des mécanismes de résistance sont mis en place par le parasite au cours de ce stade. Cette partie aborde les mécanismes de résistance de *P. falciparum* au stade sanguin (rings, trophozoïtes et

schizontes). Les mécanismes présentés ne sont pas exhaustifs et ont été sélectionnés pour introduire les résultats présentés dans la partie 2. La forme sanguine du parasite intègre plusieurs voies métaboliques fondamentales qui furent naturellement ciblées au travers du design des antipaludiques.

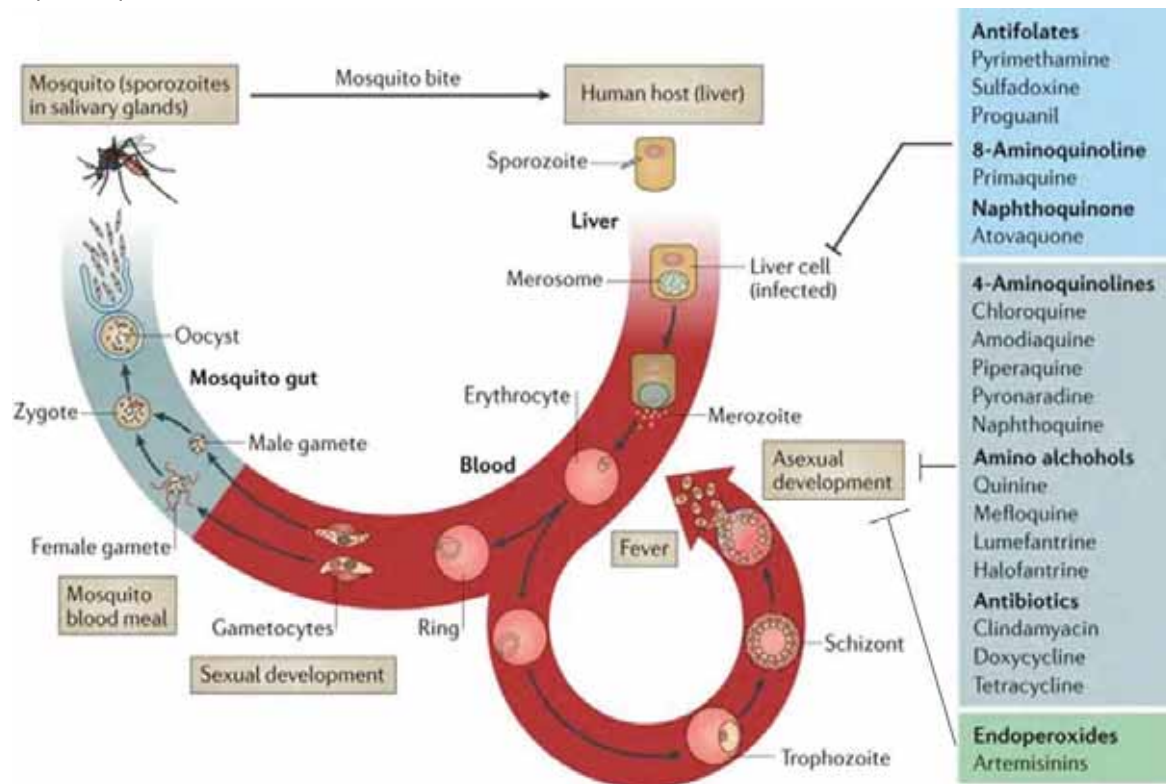


Figure 8 : Activité des principales molécules antipaludiques sur les différents stades du cycle de vie de *Plasmodium* (Haldar *et al.* 2018)

a) La synthèse des folates et des pyrimidines dans le cytosol, cible des antifolates

Le grand nombre de réplifications du génome de *Plasmodium* nécessite une production importante de pyrimidines, participant notamment à la formation des acides nucléiques (à noter que la séquence nucléotidique de *Plasmodium* est la plus riche en Adénine-Thymine séquencée à ce jour (environ 80%)) (96,97). Le métabolisme des folates permet la synthèse *de novo* de bases pyrimidiques à partir de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) (98). Cette synthèse nécessite l'action de trois enzymes : la dihydroptéroate synthétase (DHPS), la dihydrofolate synthétase, et la dihydrofolate réductase (DHFR). Ces enzymes sont la cible de plusieurs composés antipaludiques, notamment le proguanil, la

pyriméthamine et la sulfadoxine. Des mutations dans les gènes codant pour DHPS et DHFR ont été identifiées comme étant associées à la résistance de *Plasmodium* à ces molécules (99).

b) Le transport des électrons dans la mitochondrie, cible des quinones et de l'ART

Au stade érythrocytaire, le parasite ne possède qu'une seule mitochondrie (100,101). Elle contient le plus petit génome mitochondrial jamais séquencé (6-kb), qui code pour le cytochrome *b*, la cytochrome oxydase I et la cytochrome oxydase III formant la chaîne de transport des électrons (102–104). En ciblant le cytochrome *b*, l'atovaquone empêche d'autres cofacteurs de se lier à celui-ci, entraînant la chute du potentiel de membrane mitochondrial (figure 9) (105). Cette chute conduit à l'inhibition des plusieurs enzymes, dont la dihydroorotate deshydrogénase (DHOD) impliquée dans la synthèse des pyrimidines (106,107). Des mutations dans le gène codant pour le cytochrome *b* sont associées à la résistance de *Plasmodium* à l'ATQ (108). L'action inhibitrice de l'ART sur les fonctions mitochondriales a aussi été démontrée (109).

c) La détoxification de l'hème dans la vacuole digestive, cible de nombreux antipaludiques

Plasmodium a besoin de l'hémoglobine contenue dans le globule rouge hôte comme source d'acides aminés. Cependant, le métabolite ferreux (hème) de l'hémoglobine est toxique pour le parasite qui a donc besoin de le dégrader. Le catabolisme enzymatique de l'hème dans la vacuole digestive génère un cristal d'hémozoïne non toxique pour le parasite (110). Les amino-4-quinoléines (CQ, PPQ, AMQ...), la PYRO, et la QN agissent principalement sur cette voie métabolique en se liant à l'hème, interférant ainsi avec sa détoxification (111). C'est aussi grâce au métabolisme de l'hémoglobine que les dérivés de l'ART peuvent être activés. La libération d'ions ferreux Fe^{2+} permettent la scission réductrice du pont endopéroxyde de l'ART, conduisant à son activation (112). Une fois active, l'ART génère un stress oxydatif et/ou une alkylation de protéines et lipides parasitaires incluant l'hème lui-même (113), causant des dommages cellulaires irréversibles. Plusieurs études ont observé une activité optimale de l'ART sur les stades trophozoïtes, où le catabolisme de l'hémoglobine atteint son pic (114,115).

Witkowski *et al.* ont cependant observé une activité plus importante de l'ART sur les jeunes rings sensibles que sur rings plus âgés (116).

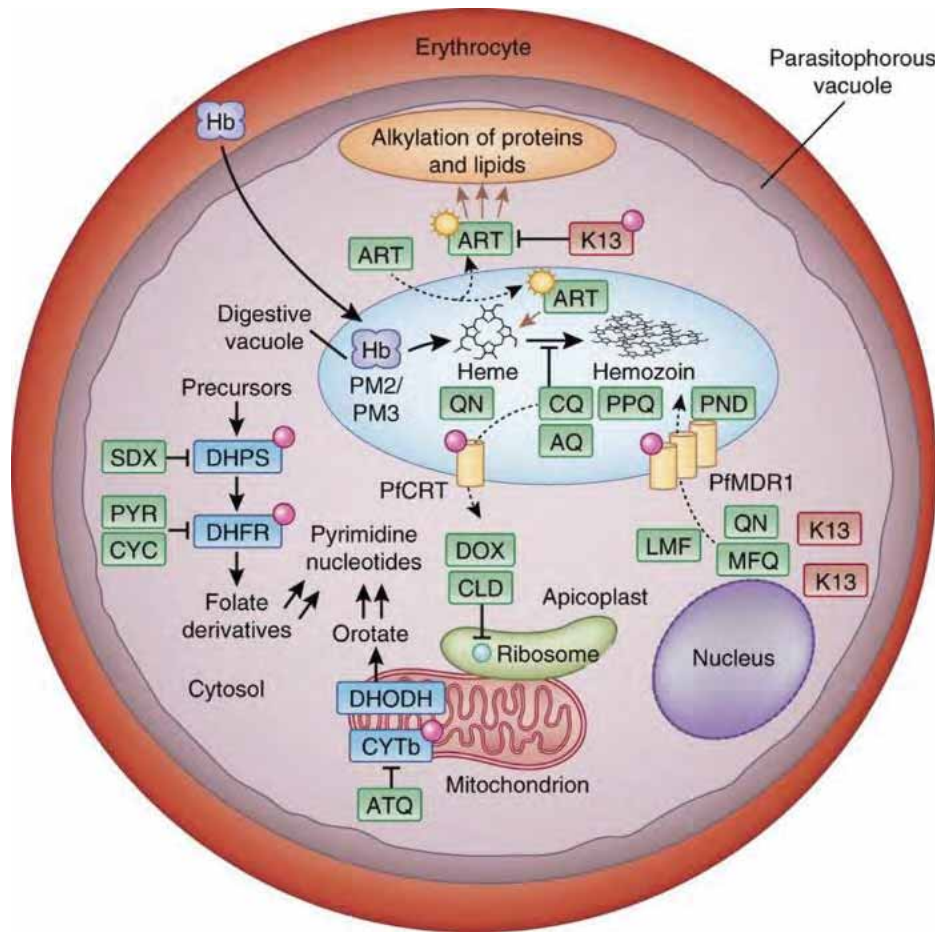


Figure 9 : Molécules antipaludiques, leurs principales cibles biologiques, et mécanismes de résistance associés.

AQ= amodiaquine, ART= artémisinine, ATQ=atovaquone, CQ= chloroquine, LMF= luméfantine, MFQ= méfloquine, QN= quinine, PND= pyronaridine, PPQ= pipéraquine, PYR= pyriméthamine, SDX= sulfadoxine
(Blasco *et al.* 2017)

2. Principaux mécanismes de résistance

De nombreux mécanismes de résistances aux antipaludiques coexistent au sein des différents organites du parasite (figure 9) (6). De façon générale, trois types de mécanismes sont impliqués dans la résistance :

- La cible biologique de l'antipaludique peut être modifiée. Certaines mutations dans des acteurs clés du métabolisme parasitaire peuvent conférer au parasite la résistance à un ou plusieurs antipaludiques. C'est le cas par exemple de la résistance à la SP, acquise par mutations ponctuelles

dans les gènes codants pour les enzymes DHFR et DHPS. L'acquisition de résistances par modification de la cible apparaît en général rapidement (36) ;

- La résistance peut aussi être acquise en limitant la concentration d'antipaludiques dans le parasite. Ce mécanisme est principalement engendré par la modification des transporteurs permettant l'entrée ou la sortie des molécules antipaludiques dans la vacuole digestive du parasite. Par exemple, des mutations dans le gène *Pfcr1*, codant pour le transporteur PfCRT permettent d'inhiber l'accumulation des amino-4-quinoléines comme la CQ et la PPQ dans la vacuole digestive. Des polymorphismes dans le gène *Mdr1*, qui code pour la glycoprotéine PGH1, agissent aussi sur les concentrations en CQ et AQ, MQ et LM du parasite dans la vacuole digestive ;

- Enfin, la résistance peut être conférée au parasite via un mécanisme de détoxification ou réparation. La modification de protéines parasitaires impliquées dans la gestion du stress oxydatif, ou dans la réparation de l'ADN et des protéines mal conformées est notamment impliquée dans la résistance à l'ART.

3. Mécanisme de résistance à l'ART

Le terme « résistance » appliqué à l'ART n'est pas tout à fait exact, puisque qu'il s'agit en fait d'un retard de la clairance parasitaire et donc d'une tolérance ou résistance partielle (figure 10) (117).

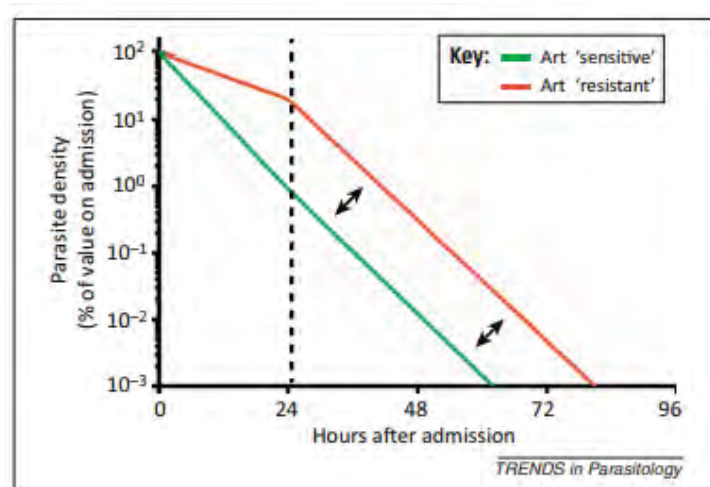


Figure 10 : Schématisation du délai de clairance parasitaire entre une souche sensible et une souche résistante à l'ART.

(Ferreira *et al.* 2013)

Les parasites résistants ont une probabilité plus élevée de causer un échec thérapeutique chez le patient traité à l'ART. Cependant, la résistance à l'ART ne suffit pas à causer un échec aux CTA. Les échecs thérapeutiques des CTA sont associés à une multi-résistance incluant également le composé partenaire.

a) Marqueur moléculaire associé à la résistance à l'ART

Le principal déterminant génétique associé à la résistance à l'ART a été découvert en exposant un isolat sensible (F32-TEM) à des doses croissantes de DHA pendant cinq ans. La souche ainsi obtenue (F32-ART) présentait une baisse de sensibilité à la DHA (118–120). Le séquençage du génome complet des souches F32-TEM et F32-ART a mis en évidence une mutation M476I dans la partie du gène *Kelch13* (*K13*, PF3D7_1343700), localisé dans le chromosome 13 du génome de *Plasmodium* de la souche F32-ART. Différents polymorphismes du gène *K13* ont ensuite été identifiés au sein d'isolats cliniques collectés au Cambodge (120). Ces mutations ont été associées à une élévation significative du temps de clairance des parasites chez les patients infectés. L'association des polymorphismes dans *K13* avec la résistance à l'ART a ensuite été confirmée phénotypiquement sur des isolats (120,121). *K13* a finalement été validé comme marqueur de résistance à l'ART par édition du génome. L'insertion d'une mutation dans *K13* d'une souche sensible suffisait à conférer la résistance à l'ART (120–122).

b) Mécanismes de résistance médiés par le gène *K13*.

La résistance à l'ART est principalement médiée par un mécanisme de réparation/gestion du stress oxydatif (123,124). La résistance à l'ART n'est pas totale et se limite à certains stades du cycle parasitaire. Il a été démontré que le stade érythrocytaire résistant à l'ART est le stade jeune ring (0-3 heures post-invasion) (125). L'une des premières observations menant à ce constat a été le retard engendré par une exposition à l'ART dans la poursuite du développement de très jeunes rings, autrement appelé dormance (112,118,125,126). Ce phénomène permettrait de mettre en pause la traduction de protéines en réponse au stress oxydatif (127). L'implication de *K13* dans la dormance

est mal connue, et une récente étude semble même suggérer que le gène ne modulerait pas ce mécanisme (128).

Depuis la découverte de *K13* comme marqueur moléculaire, plusieurs études ont tenté d'expliquer le rôle du gène dans la résistance à l'ART :

- *Gestion du stress oxydatif généré par l'ART*

Le gène *K13* présente des homologies structurales avec le gène humain *Keap1*, régulateur négatif du facteur de transcription NRF2 (nuclear erythroid 2-related factor 2) impliqué dans les réponses cellulaires au stress oxydatif. L'un des modèles retenus ces dernières années suggère que *K13*, en formant un complexe avec l'ubiquitine E3 ligase, inhiberait un facteur de transcription homologue à NRF2 en entraînant sa dégradation continue par le protéasome (120,129,130). Certaines mutations dans le gène *K13* pourraient donc empêcher la liaison entre la protéine K13 et le facteur de transcription, augmentant ainsi la réponse au stress oxydatif (figure 1.a), notamment par la régulation de la réplication de l'ADN et de la réparation de gènes (131,132).

- *Régulation de la dégradation des protéines par le protéasome*

Un deuxième modèle suggère un rôle de régulateur de l'ubiquitinylation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PfPI3K) pour *K13*. Il a été démontré que la protéine K13 issue du gène muté se liait moins à la PI3K (133). La kinase serait donc moins dégradée par le protéasome lorsque le gène *K13* est muté, favorisant l'accumulation de PI3P. L'accumulation accrue de PI3P dans les parasites résistants a été observée (133), mais son rôle demeure inconnu. La PI3K est un adaptateur impliqué dans plusieurs voies de signalisation, conduisant notamment à la réparation des protéines anormales dans le réticulum endoplasmique (132). Cette enzyme a aussi été impliquée dans l'import de l'hémoglobine dans le parasite au stade ring : l'inhibition de cette enzyme par la wortmannine aurait pour conséquence la capture de l'hémoglobine dans des vésicules au sein du cytoplasme parasitaire, empêchant son transport dans la vacuole digestive (132–134).

- *Inhibition de l'activation de l'ART lors du métabolisme de l'hémoglobine*

Très récemment, une autre fonction du gène *K13* a été proposée. La protéine K13 serait impliquée dans l'endocytose de l'hémoglobine par le parasite. L'inactivation de la protéine K13 ou les mutations dans le gène *K13* associées à la résistance à l'ART conduisaient à une réduction de l'import d'hémoglobine dans la vacuole digestive chez les jeunes rings (0-6h). Ce moindre apport d'hémoglobine aurait un effet délétère sur la croissance du parasite, mais lui conférerait en contrepartie une baisse de la sensibilité à l'ART, en réduisant l'activation de l'ART par les produits de dégradation de l'hémoglobine (135,136). Cette hypothèse va à l'encontre de l'implication de la PI3K dans l'import de l'hémoglobine (134). L'inhibition de l'ubiquitylation de la PI3K au sein du parasite *K13*-muté devrait alors conduire à un import plus important de l'hémoglobine dans la vacuole digestive, ce qui est incompatible avec le modèle associant *K13*-muté à une diminution de l'import d'hémoglobine.

- *Impact de K13 sur la résistance à d'autres molécules antipaludiques*

Les mutations dans *K13* pourraient impacter le degré de résistance du parasite à d'autres molécules. Il a été montré que l'induction de la résistance à l'ART *in vitro* induisait aussi un changement de susceptibilité à d'autres composés antipaludiques comme l'AQ, la MQ, et la pyriméthamine chez la souche F32-ART (119). Cette résistance multiple impliquant la quiescence du parasite, elle pourrait néanmoins être un effet « secondaire » non spécifique aux molécules citées ci-avant.

c) Mécanismes de résistance non médiés par le gène *K13*

D'autres protéines ont été identifiées comme étant impliquées dans la résistance à l'ART, notamment la ferrédoxine, PfCRT (chloroquine resistance transporter) (93), PGH1 (P-glycoprotein homologue 1) (137), les falcipaines (138,139), et nombreux autres candidats identifiés par études d'association pangénomiques (93,124). Les études du mécanisme de résistance à l'ART ces dernières années s'étant principalement concentrées sur le gène *K13*, peu d'informations sont disponibles concernant le degré d'implication de ces autres protéines dans la résistance. La récente observation d'isolats *K13*-sauvages

résistants à la DHA au Cambodge confirme l'implication d'autres acteurs dans la résistance à l'ART (140). Le mécanisme de résistance à l'ART non médié par *K13* a été étudié plus en détail dans la partie « Travaux de recherche ».

d) Epidémiologie de la résistance à l'ART

Depuis son émergence à l'Ouest du Cambodge en 2006 (43), la résistance à l'ART s'est propagée en Asie du Sud Est (45,61,62). Elle est désormais établie dans tout le Cambodge, en Thaïlande, au Vietnam, au Laos et au Myanmar (62). Deux études récentes ont rapporté l'émergence de souches résistantes à l'ART en Inde (associée aux mutations *K13*-G625R et R539T) et en Papouasie Nouvelle Guinée (médiée par la mutation *K13*-C580Y) (141,142). La résistance à l'ART n'a jamais été rapportée en Afrique à l'exception d'un cas en Guinée Equatoriale, où un travailleur immigré chinois avait contracté une souche mutée *K13*-M579I, jamais reportée auparavant (143). Plus de 150 polymorphismes du gène *K13* ont pu être identifiés au cours de différentes études à large spectre géographique (144,145). Plus de 20 mutations non-synonymes ont été associées à la résistance à l'ART. La répartition des principaux polymorphismes de résistance du gène *K13* en Asie du Sud Est est indiquée dans la figure 11. À la date de publication de cette étude (2015), une dizaine d'allèles du gène *K13* étaient présents dans la région du Grand Mékong (Cambodge, Vietnam et Laos). La principale mutation était la C580Y (144), malgré un plus haut niveau de résistance à la DHA *in vitro* observé chez les souches R539T et I543T par exemple (120,121), alors largement moins prévalentes. La répartition de ces polymorphismes a évolué ces dernières années. Une étude récente a montré l'exclusivité de l'allèle *K13*-C580Y au Cambodge, Laos et Thaïlande (62). L'évolution des polymorphismes du gène *K13* ces quatre dernières années au Cambodge a été étudiée dans la partie « travaux de recherche ».

De nombreux polymorphismes du gène *K13* ont aussi émergé de façon indépendante en Afrique (93,146). Certaines mutations non-synonymes identifiées en Asie du Sud Est et associées à la résistance à l'ART ont été retrouvées en Afrique, sans être associées à la résistance à l'ART (147,148). Les parasites collectés en Asie et en Afrique appartiennent à deux groupes phylogénétiques bien

distincts, suggérant une émergence locale des polymorphismes observés en Afrique (93). En Amérique du Sud, peu de mutations dans le gène *K13* ont été identifiées. L'émergence de souches *K13*-C580Y a pu être observée, indépendamment des souches asiatiques, sans association démontrée avec la résistance à l'ART (149).

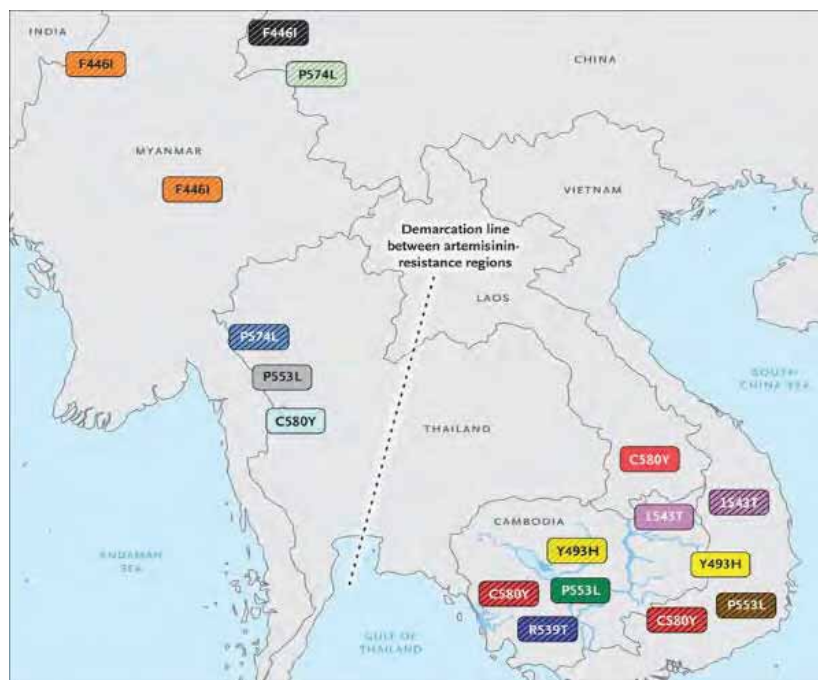


Figure 11 : Carte des différents polymorphismes du gène *K13* associés à la résistance à l'ART en Asie du Sud-Est.

(Ménard *et al.* 2015)

4. Mécanisme de résistance à la pipéraquline

La PPQ a été utilisée en monothérapie au Cambodge dans les années 1990, puis en combinaison avec la DHA dans les années 2000. Une faible proportion de parasites résistants à la PPQ était déjà présente en 2002-2003 au Cambodge (92). À partir de 2008, date d'implémentation de la DHA-PPQ comme traitement de première ligne au Cambodge, la résistance à la DHA-PPQ a rapidement émergé et s'est propagée dans la région du Grand Mékong (92).

a) Marqueurs moléculaires de résistance à la PPQ

- *Plasmepsine2* et *Plasmepsine3*:

La comparaison des génomes complets de souches sensibles et résistantes à la PPQ isolées au Cambodge a permis d'identifier l'amplification des gènes *Plasmepsine2* (*Pm2*) et *Plasmepsin3* (*Pm3*) comme marqueurs moléculaires de résistance à la PPQ (150,151). La délétion des gènes *Pm2/Pm3* dans la souche de référence 3D7 entraînait une diminution de la sensibilité à la PPQ (en comparaison avec une souche 3D7 non éditée) (152). Ces gènes codent pour des protéases qui une fois activées dans la vacuole digestive du parasite jouent le rôle d'hémoglobinasés. L'amplification des gènes *Pm2/Pm3* permettrait de compenser l'inhibition de la détoxification de l'hème causée par la PPQ, en accélérant le catabolisme de l'hémoglobine et de ce fait, en apportant plus d'énergie au parasite (150,153). Il a cependant été démontré que la surexpression de *Pm2* et *Pm3* seule sur un fond génétique 3D7 ne suffisait à conférer la résistance à la PPQ, suggérant l'implication d'autres facteurs (154).

- *PfCRT*:

Le gène *Crt* a par la suite été identifié comme second marqueur de résistance à la PPQ. CRT est un transporteur situé sur la membrane de la vacuole digestive du parasite (figure 10). Des mutations dans ce gène ont été impliquées dans l'efflux de la CQ hors de la vacuole digestive, empêchant ainsi la liaison de la CQ à l'hème (155,156). Des souches cambodgiennes présentant les mutations H97Y, M343L ou G353V dans CRT sur fond génétiques Dd2 (fond génétique asiatique possédant des polymorphismes associés à la résistance à la CQ) avaient un taux de survie à la PPQ plus élevé en comparaison avec des souches de fond génétique Dd2 non mutées (60). De plus, l'introduction de la mutation C101F dans CRT d'une souche au fond génétique Dd2 induisait la résistance de cette souche à la PPQ *in vitro* (153). Une autre étude a associé la mutation F145I avec un risque cinq fois plus élevé de causer un échec à la DHA-PPQ (157). L'implication de *Crt* dans la résistance à la PPQ a été confirmée en introduisant les mutations identifiées dans les précédentes études sur un fond génétique Dd2 (158). Ces mutations étaient associées à une augmentation de la résistance à la PPQ *in vitro* des

souches éditées. D'autres mutations associées à la résistance à la PPQ ont aussi été identifiées (T93S et I218P) (158).

Les deux marqueurs moléculaires de la résistance à la PPQ *Pm2/3* et *Pfcrt* sembleraient être liés. En effet, les souches *Crt*-mutées présentent une altération de la digestion enzymatique de l'hémoglobine. Ceci conduit à une réduction du « fitness » du parasite, ainsi privé d'acides aminés essentiels (159). L'amplification de *Pm2/Pm3* permettrait de compenser le coût des mutations dans le gène *Crt* sur le « fitness » du parasite, en facilitant la dégradation de l'hémoglobine (158). Cependant, ces deux marqueurs ne sont pas strictement associés. Des isolats présentant une amplification des gènes *Pm2/3* seule peuvent être résistants à la PPQ (150). Inversement, des mutations dans le gène *Crt* peuvent de façon indépendante à *Pm2/3* conférer la résistance à la PPQ (158).

b) Épidémiologie de la résistance à la PPQ

La résistance à la PPQ a émergé pour la première fois en Chine à la fin des années 1980, mais aucune étude n'a fait état de la diffusion de cette résistance jusqu'à l'introduction de la DHA-PPQ au Cambodge en 2008 (160,161). Des souches présentant l'allèle K13-C580Y ainsi qu'une amplification des gènes *Pm2/Pm3* ont été sélectionnées par l'utilisation de la DHA-PPQ. Ces souches ont été appelées KEL1/PLA1 (92). Elles ont rapidement diffusé dans la région du Grand Mékong, où elles sont aujourd'hui confinées (Cambodge, Thaïlande, Vietnam, Laos) (94,68,69,161).

Parmi les souches KEL1/PLA1, certains sous-groupes ont acquis des mutations dans le gène *Crt*, associées à la résistance à la PPQ. La prévalence de ces mutations (principalement T93S, H97T, P145I, and I218F) a rapidement augmenté à la suite de l'utilisation de la DHA-PPQ comme traitement de première ligne ces cinq dernières années au Cambodge, au Vietnam et en Thaïlande (162–164).

L'amplification des gènes *Pm2/3* a aussi été décrite en Afrique. Deux études récentes ont observé une proportion élevée d'isolats présentant une amplification de *Pm2/3*, notamment au Burkina Faso et en Ouganda (165,166). La présence de mutations dans le gène *Crt* associées à la résistance à la PPQ n'a pas été observée en Afrique.

5. Mécanisme de résistance à la méfloquine

L'utilisation de la MQ en monothérapie dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle a favorisé l'émergence de la résistance en Thaïlande.

a) Marqueur moléculaire de résistance

Le gène *Mdr1* (Multidrug resistance gene 1) a été découvert comme marqueur moléculaire de résistance à la MQ en 2004 (167). L'augmentation du nombre de copies du gène était associée aux échecs du traitement, ainsi qu'à une réduction de la sensibilité de parasites isolés en Thaïlande à la MQ (167). Le gène *Mdr1* code pour la glycoprotéine PGH1, une pompe à efflux ATP-dépendante située sur la membrane de la vacuole digestive. L'amplification du gène *Mdr1* ainsi que certains polymorphismes dans ce gène affectent la concentration de plusieurs molécules antipaludiques à l'intérieur du parasite, conférant ainsi la résistance (168). Des mutations dans le gène *Mdr1* ont été identifiées comme étant impliquées dans la résistance aux amino-4-quinoléines (CQ, AQ). Les mutations N86Y et D1246Y dans le gène *Mdr1* (fréquemment retrouvées en Afrique) ont par exemple été associées à la résistance à la CQ, mais aussi à une augmentation de la sensibilité à la MQ, à la LM et à l'ART (21,137,169).

Une opposition entre les résistances à la MQ et à la PPQ a pu être observée (170). Les parasites présentant une amplification du gène *Mdr1* n'ont en général qu'une seule copie des gènes *Pm2/Pm3*, et vice versa. Les souches résistantes à la PPQ l'étaient rarement simultanément à la MQ *in vitro* (171,172). De plus, l'utilisation de la DHA-PPQ en Asie du Sud Est a entraîné une diminution drastique de l'amplification du gène *Mdr1* au profit de l'amplification des gènes *Pm2/3*, allant dans le sens de mécanismes de résistance à la PPQ et la MQ opposés.

Cependant, des parasites « triples mutants » présentant une mutation dans le gène *K13*, associée à l'amplification des gènes *Pfmdr1* et *Pm2/Pm3* ont été récemment identifiés en haute proportion au Cambodge (173). La prévalence et le phénotype de ces parasites multi-résistants ont été étudiés dans la partie « travaux de recherche ».

b) Épidémiologie de la résistance à la MQ

La résistance à la MQ a émergé dans les années 1990 à la frontière Thaïlande-Myanmar, six ans après son introduction. En 1994, plus de 50% des infections étaient alors recrudescents après traitement à la MQ dans cette région (174). En conséquence, la MQ a été utilisée en combinaison avec l'AS à partir de 1994 au Myanmar, en Thaïlande et au Cambodge. La résistance à la MQ est devenue problématique au Cambodge après l'augmentation des échecs thérapeutiques de l'AS-MQ à la fin des années 2000, associée avec une augmentation des isolats *Mdr1*-amplifiés (59,68,175). Le remplacement de l'AS-MQ par la DHA-PPQ en 2008 a conduit à une quasi-disparition des souches résistantes à la MQ dans cette région, caractérisée par la disparition de l'amplification du gène *Mdr1*, et le retour de la susceptibilité à la MQ *in vitro* (92). L'AS-MQ ayant été réintroduit comme traitement de première ligne au Cambodge en 2016, le profil de résistance des parasites à la MQ est susceptible d'évoluer rapidement. Cette évolution a été décrite dans la partie « travaux de recherche ».

Cette combinaison est peu utilisée hors Asie du Sud Est. La résistance à la MQ y est absente, à l'exception de quelques cas de résistance à la prophylaxie du voyageur observés en Afrique (176,177). L'amplification du gène *Mdr1* est rarement observée en Afrique et en Amérique du Sud (178).

C. Les méthodes de surveillance de la résistance aux antipaludiques

La surveillance de l'efficacité des molécules antipaludiques reste l'un des principaux moyens de contrôle des résistances. Elle a en effet permis d'adapter les traitements aux différents profils de résistance observés dans les zones d'endémie. Plusieurs outils sont aujourd'hui disponibles pour suivre en temps réel la résistance.

1. Les études cliniques d'efficacité thérapeutique

Les études cliniques sont conduites dans un environnement contrôlé, pendant une durée fixe, et sous supervision médicale (179). Elles permettent d'évaluer l'efficacité clinique et parasitologique d'un traitement (réussite du traitement, clairance parasitaire et effets secondaires). Les patients sont

soumis à différents critères d'inclusion selon l'étude réalisée (âge, parasitémie, symptômes...). Le diagnostic du paludisme est déterminé par tests rapides et par lectures de gouttes épaisses/frottis sanguins. La qualité des médicaments utilisés lors de ces études est normalement vérifiée. Après administration du traitement, les patients sont suivis à jour 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 et 42 (le suivi à jour 42 n'est obligatoire que pour les médicaments ayant une demi-vie d'élimination lente). Ce suivi reste cependant contraignant pour les patients qui ne peuvent parfois pas se présenter au centre de santé. Ces études permettent la collection d'échantillons sanguins. Ces échantillons permettent d'effectuer des tests supplémentaires facultatifs, comme le dosage des antipaludiques dans le sang, l'évaluation *in vitro* de la sensibilité des isolats parasites à différentes molécules, et aussi l'exploration des marqueurs moléculaires de résistance (179).

2. Les tests d'évaluation de la résistance *in vitro* et *ex vivo*

Il est important de surveiller l'efficacité de différentes molécules antipaludiques sur les isolats parasites collectés en complément du suivi clinique. La surveillance *in vitro* est néanmoins difficile à mettre en œuvre en zones d'endémie. La culture de *P. falciparum* nécessite en effet un environnement et matériel rigoureusement stérile, de nombreux réactifs et un personnel qualifié. Mais une fois en place, ces dispositifs peuvent aider à apporter des informations cruciales sur la sensibilité des isolats et leurs mécanismes de résistance. Plusieurs tests d'évaluation phénotypique de la sensibilité parasite ont été mis au point ces dernières années. Ces tests visent en général à déterminer la CI_{50} d'une molécule (concentration d'antipaludique nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition parasite). Les méthodes de détermination de la CI_{50} reposent le plus souvent sur l'incorporation d'un agent isotopique (hypoxanthine tritiée) ou fluorescent (SYBR Green ou autres fluorophores) dans le parasite afin de mesurer sa multiplication et sa viabilité. Des tests de dosage protéiques peuvent aussi être utilisés (dosage des protéines histidine-rich protein 2 (HRP2) ou lactate déshydrogénase (LDH)). Cependant ces méthodes conventionnelles d'évaluation de la sensibilité ne conviennent pas pour toutes les molécules antipaludiques. Il a en effet été montré que la CI_{50} n'était

dans certains cas pas un bon indicateur de la résistance, notamment pour l'ART et la PPQ (60,116). Ces dernières années, des tests d'évaluation microscopique du taux de survie parasitaire ont été développés afin de mieux mimer les temps et doses d'exposition aux antipaludiques observés *in vivo*. Le plus utilisé est le RSA (ring stage survival assay), développé par Witkowski *et al.* en 2013 (figure 12) (116).

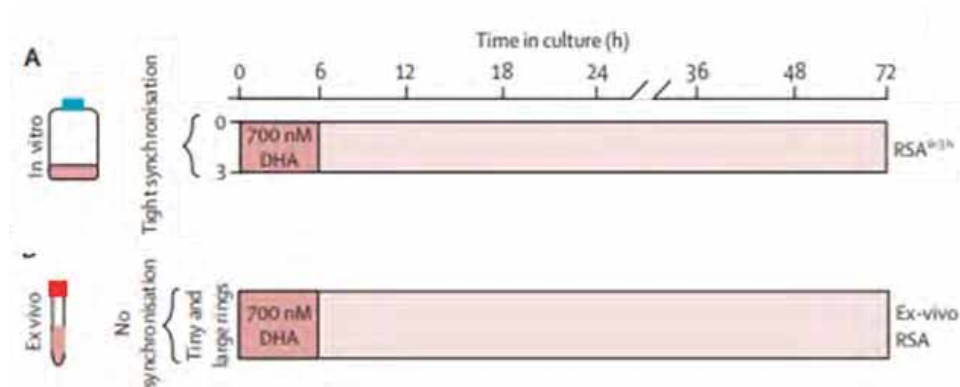


Figure 12 : Protocole du RSA *in vitro* et *ex vivo*
(Witkowski *et al.* 2013)

Ce test peut aussi bien être réalisé *ex vivo* directement à partir du sang de patient, qu'*in vitro* sur des parasites synchronisés entre 0 et 3 heures post-invasion (RSA^{0-3h}). Un haut pourcentage de survie en RSA^{0-3h} a été associé à un retard de la clairance des parasites cambodgiens après traitement à la DHA (116,120,180). Des RSA alternatifs ont depuis été développés par plusieurs équipes, en utilisant de nouvelles techniques de détection ou bien en adaptant le temps d'exposition à l'ART (181–183). Sur le même principe, le PSA (piperaquine survival assay) a été développé par la même équipe en 2015 pour évaluer la sensibilité à la PPQ. Le protocole est identique à celui du RSA, aux seules différences de la dose (200 nM) et du temps d'exposition (48 heures) (60).

3. Les outils moléculaires de surveillance de la résistance

L'évaluation de la sensibilité *in vitro*, associée aux techniques de séquençage et d'édition du génome, ont permis de découvrir plusieurs marqueurs moléculaires associés à la résistance aux molécules antipaludiques. Le RSA a notamment permis de découvrir le marqueur de résistance à l'ART *K13*, en comparant les génomes complets de souches ayant un RSA élevé à celles ayant un RSA bas. Le

séquençage du génome entier a grandement facilité la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires. Les techniques d'édition du génome, notamment par des nucléases (en doigts de Zinc ou Crispr Cas9) permettent de valider ces marqueurs moléculaires, en observant l'effet de leur délétion ou de leur introduction sur la sensibilité parasitaire aux antipaludiques. De nombreux marqueurs moléculaires de résistance ont été découverts cette dernière décennie, et sont listés dans le tableau 1 (184).

Les outils moléculaires permettent aussi de déterminer si les échecs thérapeutiques observés lors des études d'efficacité clinique sont causés par une réinfection du patient par autre clone parasitaire au cours du traitement, ou par une recrudescence du parasite initial. Pour cela, différentes techniques de génotypage peuvent être utilisées. La plus utilisée consiste à comparer les profils génétiques de trois gènes hautement polymorphiques du parasite : merozoite surface protein 1 (*mSP1*), merozoite surface protein 2 (*mSP2*), and glutamate rich protein (*glurp*). Un profil identique confirmera la recrudescence parasitaire. De nouvelles techniques plus précises de génotypage comme les marqueurs microsatellites et l'électrophorèse capillaire sont aussi disponibles (185–187).

Classe d'antipaludique	Mécanisme d'action	Molécules	Marqueurs moléculaires de résistance
4-aminoquinoléines	Interfère avec la detoxification de l'hème	Chloroquine Amodiaquine	SNP dans <i>Pfcr</i> (K76T) SNP dans <i>Pfmdr1</i> (N86Y)
		Pipéraquline	SNPs dans <i>Pfcr</i> (C101F, T93S, H97Y, F145I, M343I, G353V) Amplification de <i>Plasmepsin2</i> et <i>Plasmepsin3</i> <i>Pfmdr1</i> une copie
8-aminoquinoléines	Inconnu	Primaquine Tafénoquine	Inconnus
Antifolates	Inhibition de la synthèse des folates	Inhibiteurs DHFR (proguanil, pyriméthamine)	SNPs dans <i>Pfdhfr</i> (S108N, N51I, C59R, I164L) Amplification de la <i>gtp</i> cyclohydrolase1
		Inhibiteurs DHPS (sulfadoxine)	SNPs dans <i>Pfdhps</i>
Aryl amino-alcools	Mal connu, interfère avec la detoxification de l'hème	Lumefantrine	Amplification de <i>Pfmdr1</i>
		Mefloquine	
		Quinine	Mal connus, médiateurs de résistance à la LM et MQ
Naptoquinones	Inhibition du cytochrome <i>bc₁</i>	Atovaquone	SNPs dans <i>Cyt-b</i> (Y268S/C/N)
Dérivés d'artémisinine	Stress oxydatif	DHA, artesunate, artemether	SNPs dans <i>Kelch13</i>

Tableau 1 : Principaux marqueurs moléculaires associés à la résistance aux antipaludiques
(Adapté de Cowell *et al.* 2019)

III. Epidémiologie du paludisme et des résistances : exemples du Cambodge et du Cameroun

Le travail effectué durant cette thèse a porté sur deux pays présentant des caractéristiques épidémiologiques de transmission et de résistance du paludisme bien différentes : le Cambodge, pays à faible transmission mais qui est l'épicentre de la résistance aux traitements, et le Cameroun, où la transmission est beaucoup plus forte mais la résistance aux CTA n'a pas encore émergé malgré la pression de sélection médicamenteuse.

A. Epidémiologie du paludisme

1. Au Cambodge

Situé au cœur de la région du Grand Mékong, le Cambodge est un pays au climat tropical d'environ 15 millions d'habitants. La transmission de *P. falciparum* y est faible, et principalement concentrée dans les zones rurales, notamment les forêts et villages environnants (188,189). La prévalence du paludisme est plus importante au Nord-Est du Cambodge, avec un maximum de 50 cas détectés pour 1000 habitants dans certaines zones en 2017 (figure 13) (41).



Figure 13 : Incidence de *P. falciparum* au Cambodge en 2017 (nombre de cas pour 1000 habitants) (OMS, World Malaria Report 2018)

L'Ouest cambodgien est moins touché, à l'exception de la province de Pursat. Les régions de plus forte prévalence concentrent les forêts, qui disparaissent à grande vitesse dans le pays à cause du commerce du bois (190). Le pic de transmission du paludisme au Cambodge survient au moment de la saison des pluies, de juillet à novembre, et principalement la nuit du fait de l'activité nocturne des anophèles. Les principales espèces d'anophèles vectrices du paludisme à *P. falciparum* et *P. vivax* au Cambodge sont *Anopheles minimus* et *An. dirus* (188). Entre 2012 et 2016, la prévalence du paludisme a drastiquement diminué au Cambodge. Cependant, depuis 2016, en raison de plusieurs facteurs incluant la résistance aux CTA de première ligne utilisés depuis 2012, le Cambodge fait face à une hausse de la prévalence du paludisme (figure 14) (1).

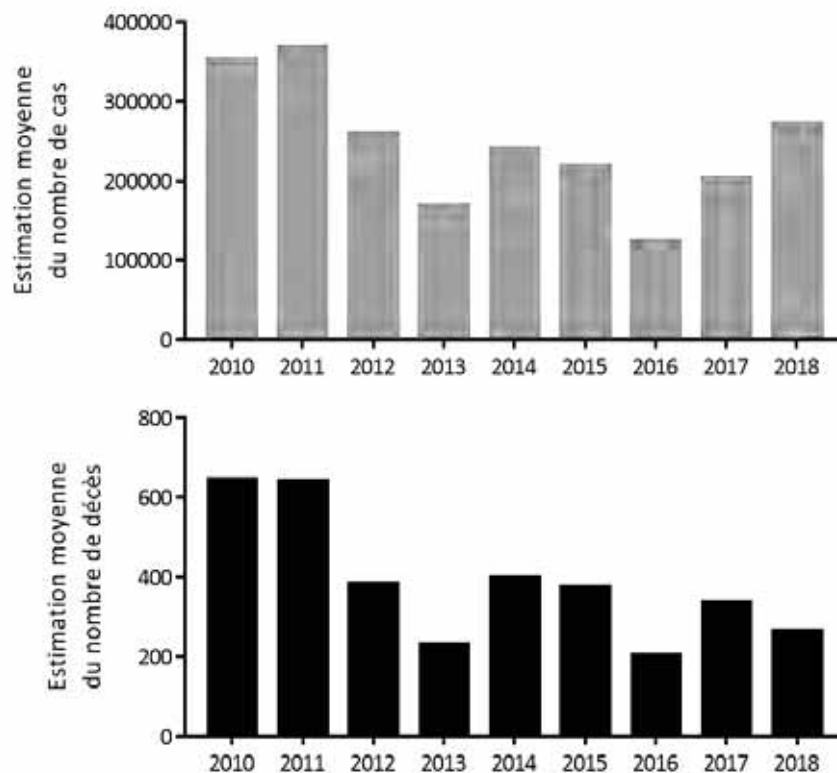


Figure 14 : Estimation moyenne du nombre de cas et de décès liés au paludisme de 2010 à 2018 au Cambodge, *P. falciparum* et *P. vivax* confondus.
(Adapté de OMS, World Malaria Report 2019)

L'augmentation a heureusement été rapidement contrôlée et pour la première fois en 2018, aucun décès lié au paludisme n'a été rapporté au Cambodge (cette information est en désaccord avec les données de l'OMS, souvent surestimées par rapport aux données nationales) (191) ; le pays qui était jusqu'à présent en phase de contrôle de l'épidémie, devrait passer en phase d'élimination d'ici 2025

(4). Les progrès réalisés ont été possibles grâce à la mise en place d'une politique de traitement et de suivi efficace des patients (utilisation des CTA depuis 2000), à un meilleur diagnostic (tests de diagnostic rapide et détection par microscopie) et à l'amélioration des stratégies d'élimination vectorielle (distribution de moustiquaires imprégnées aux habitants, meilleure information, sprays insecticides). La déforestation du Cambodge a aussi joué un rôle conséquent dans la baisse de prévalence du paludisme ces dernières années (188).

L'éradication complète du paludisme au Cambodge reste encore un objectif difficile à atteindre malgré la faible prévalence observée dans le pays. Le Cambodge a en effet la particularité d'être l'épicentre de l'émergence de toutes les résistances aux antipaludiques observées au cours du siècle dernier. La plupart des parasites sont même devenus multi-résistants aux CTA de première ligne utilisés ces 20 dernières années. Le second obstacle à l'élimination de *Plasmodium* au Cambodge est le réservoir difficilement détectable que représentent les infections asymptomatiques. *P. falciparum* et *P. vivax* continuent à se transmettre principalement chez les hommes âgés de 15 à 49 ans travaillant dans les forêts, parfois sans que ceux-ci ne présentent le moindre symptôme (188,189). Cette population ayant régulièrement été exposée au parasite, elle a pu développer une immunité partielle contre lui. Cependant, le nombre moyen de piqûres infectantes par an au Cambodge est faible (moins d'une piqûre par semaine dans les zones de forte prévalence) en comparaison par exemple de pays à forte transmission africains où le nombre de piqûres infectantes peut dépasser 300 par année (192,193). De ce fait, les patients cambodgiens sont en général moins exposés au parasite et ont un risque plus important que les patients africains de développer une infection symptomatique. Au Cambodge seuls 3,7% des patients infectés par *Plasmodium* sont des enfants de moins de cinq ans, en opposition à la situation africaine où cette catégorie d'âge est majoritairement touchée, car moins immune (194). Des politiques de traitements de masse ont été entreprises au Cambodge afin de limiter le réservoir de parasites chez les patients asymptomatiques et ont montré leur efficacité en terme de réduction de la prévalence (195–197). Au Cambodge, la prévalence de *P. vivax* tend maintenant à égaler celle de *P. falciparum*. En 2017, 58% des cas de paludisme étaient causés par *P. falciparum*, contre 42% par

P. vivax (1). La capacité de *P. vivax* à entrer en dormance dans le foie sous la forme d'hypnozoïtes en fait un parasite moins facilement détectable par les méthodes classiques de diagnostic utilisées sur le terrain.

2. Au Cameroun

Le Cameroun est un pays au climat tropical d'environ 25 millions d'habitants situé en Afrique centrale. La situation du paludisme au Cameroun est à plusieurs niveaux différente de celle du Cambodge. La transmission de *P. falciparum* est très élevée, notamment au Sud-Est du pays qui concentre les forêts (figure 15.A) (198,199). La prévalence du parasite chez l'Homme est supérieure à 80%, et l'incidence du paludisme supérieure à 100 cas pour 1000 habitants dans la quasi-totalité du pays (figure 15.B) (1,41,198).

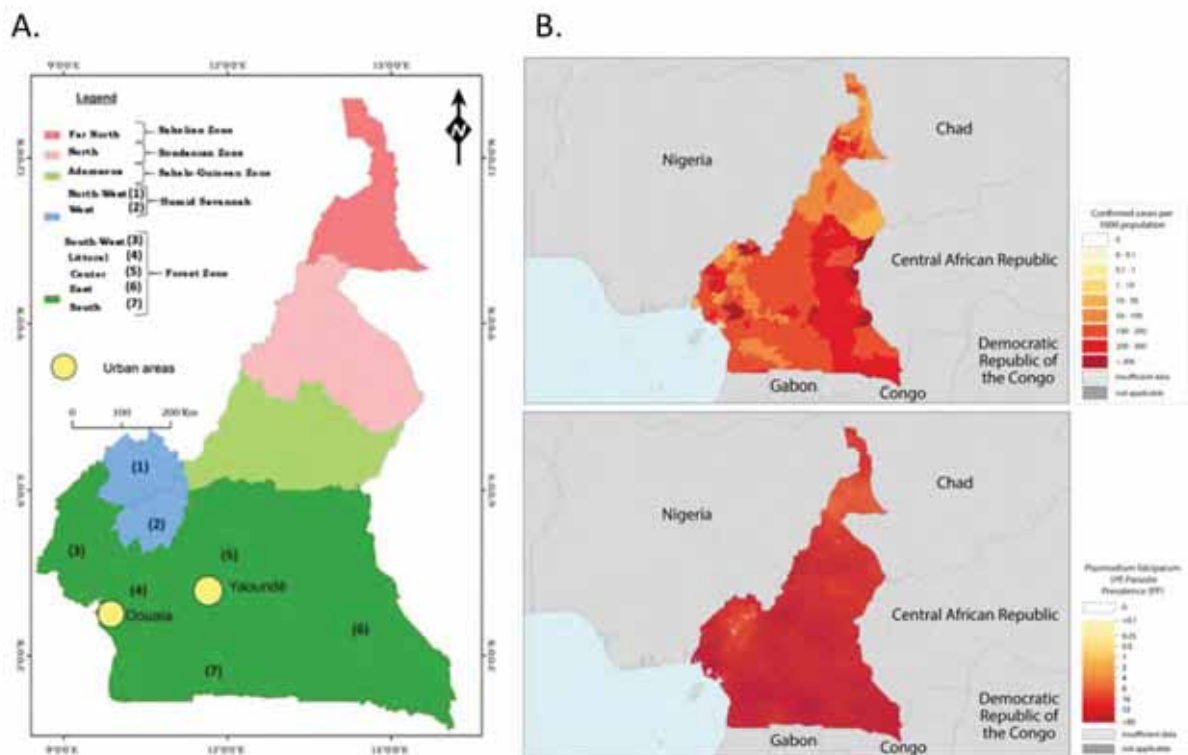


Figure 15 : A. Carte du Cameroun indiquant les différents climats par région (Antonio-Nkondjio *et al.* 2019)
 B. Incidence et prévalence de *P. falciparum* au Cameroun en 2017. (OMS, World Malaria Report 2018)

Le nombre de cas en 2019 a été estimé à 7,3 millions, et le nombre de décès à plus de 10000. La grande majorité des cas est attribuée à *P. falciparum* (200). L'incidence du paludisme au Cameroun a augmenté ces dernières années (figure 16) (1). La raison de cette augmentation n'est pas claire et est probablement le résultat de multiples facteurs, notamment un meilleur recueil des données cliniques ces dernières années.

Les principaux moyens de lutte contre *P. falciparum* au Cameroun sont les CTA et l'utilisation d'insecticides, en combinaison avec les moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cependant les anophèles sont rapidement devenus résistants à toutes les molécules insecticides disponibles au Cameroun. C'est pourquoi le pays tente maintenant d'ajouter la suppression des gîtes larvaires à son panel d'intervention (198,199). Depuis l'introduction des CTA en 2004 au Cameroun, la résistance n'a pas été observée mais la possible propagation de la résistance à l'artémisinine (ART) en Afrique suscite l'inquiétude et nécessite une surveillance accrue.

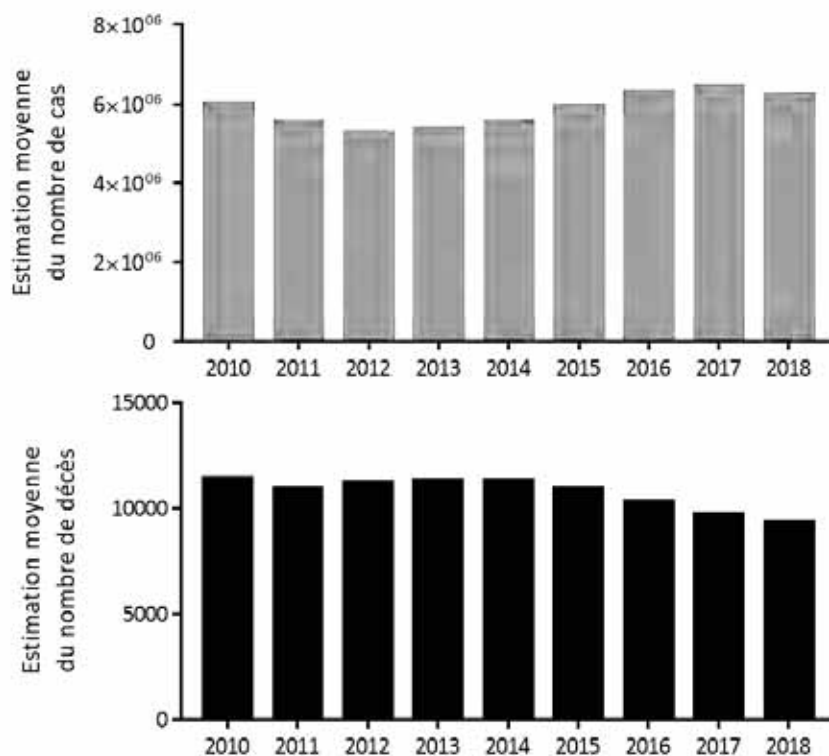


Figure 16 : Evolution du nombre moyen de cas et décès liés à *P. falciparum* de 2010 à 2018 au Cameroun

(OMS, World Malaria Report 2019)

Le Cameroun possède une très grande diversité d'anophèles avec plus de 50 espèces répertoriées. Les principales espèces vectrices sont *An. gambiae* (s.s.), *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* and *An. moucheti* (201). Le taux d'inoculation entomologique est important même dans les zones urbaines (jusqu'à 92 piqûres infectantes par homme par année à Yaoundé) (202). Le taux d'inoculation entomologique peut même atteindre 100 piqûres infectantes par mois dans la forêt équatoriale camerounaise (199). Ainsi, la plupart des individus adultes présentent une immunité partielle dirigée contre le parasite, permettant d'éviter le développement de formes sévères. Les enfants de moins de cinq ans qui n'ont pas encore développé d'immunité partielle contre *Plasmodium* sont beaucoup plus à risque. La prévalence de *P. falciparum* chez les enfants de 2 à 9 ans peut atteindre 40% des cas de paludisme au Cameroun lors de la saison des pluies (199).

B. Bilan récent de la résistance aux CTA

1. Au Cambodge

Le traitement de première ligne utilisé depuis 2016 au Cambodge est l'AS-MQ, associé à une faible dose unique de PQ. L'AS-PYR (Pyramax®) associé à une faible dose unique de PQ est aussi en cours d'essai clinique depuis 2017. L'utilisation de la DHA-PPQ de 2012 à 2016 avait conduit à la sélection et à la multiplication de souches résistantes à la fois à l'ART et à la PPQ. Ces résistances ont conduit à près de 50% d'échecs cliniques à la DHA-PPQ dans certaines régions du Cambodge, poussant les autorités de santé à changer de traitement (61,64). Plus de la moitié des souches de *P. falciparum* cambodgiennes présentaient en effet la mutation C580Y dans le gène *K13*, associée à la résistance à l'ART, ainsi que l'amplification des gènes *Pm2/Pm3*, associés à la résistance à la PPQ (KEL1/PLA1). La prévalence des mutations dans le gène *Crt*, aussi impliquées dans la résistance à la PPQ, ont rapidement augmenté de 2013 à 2018 (91,158,162,163).

La pression de sélection exercée par la drogue partenaire semble essentielle dans la sélection des clones multi-résistants (172,203). L'étude de Parobek et collaborateurs a démontré que les souches

cambodgiennes résistantes à l'AS-MQ provenaient d'un cluster phylogénétique bien distinct de celui des souches résistantes à la DHA-PPQ (172). Aussi, la mutation R539T de *K13* était exclusivement associée au cluster génétique concentrant une majorité de souches résistantes à la MQ, mais pas à la PPQ *in vitro*. Ceci explique que la prévalence de certains mutants *K13*, présents au Cambodge pendant l'utilisation de l'AS-MQ (2000-2012) a nettement diminué au cours des années d'utilisation de la DHA-PPQ au profit de la mutation C580Y.

La PQ faiblement dosée a été ajoutée à toutes les CTA testées depuis 2017 au Cambodge. La sûreté de ces combinaisons sur les populations G6PD-déficientes a été prouvée. L'action gamétocyticide de la PQ a pour but de ralentir la transmission des parasites. La question de la résistance à l'AS-MQ + PQ et à l'AS-PYR + MQ depuis 2016 sera abordée dans la partie « travaux de recherche ».

Pourquoi le Cambodge est-t-il l'épicentre de l'émergence de la multi-résistance aux antipaludiques ? Une première réponse peut être apportée par la forte exposition des parasites à différentes monothérapies au cours du siècle dernier, puis aux CTA, en raison de l'importante proportion d'infections symptomatiques à *P. falciparum* au Cambodge. De plus, au Cambodge la plupart des infections sont monoclonales : les parasites ne sont donc pas soumis à une compétition entre clones. Le coût de la résistance sur le fitness du parasite est donc moins important. Aussi, la faible immunité acquise des patients cambodgiens élimine probablement plus difficilement les parasites résistants, conférant à ceux-ci un avantage évolutif. Certaines hémoglobinopathies (HbAE, HbEE) ainsi que la déficience pour l'enzyme G6PD ont une forte prévalence au Cambodge et pourraient aussi avoir un rôle dans l'apparition des résistances (204–207). Ces perturbations altèrent en effet l'équilibre d'oxydoréduction des globules rouges, protégeant ainsi contre les formes sévères du paludisme. Elles pourraient avoir un impact sur l'action de certaines molécules, notamment l'ART qui provoque un stress oxydatif. Enfin, l'hypothèse d'un taux plus important de mutations non-synonymes dans l'ADN des parasites cambodgiens pourrait faciliter l'émergence de résistance. L'effet d'un suivi incomplet des traitements par les patients et la distribution de médicaments contrefaits sur la sélection de

résistances au Cambodge doit être moindre puisque ce problème est aussi présent en Afrique, où la résistance aux CTA n'a pas émergé.

2. Au Cameroun

Le Cameroun utilise officiellement deux traitements de première ligne différents depuis 2004 et 2006 respectivement : l'ASMQ et l'AL (1). Ces deux combinaisons sont toujours efficaces, malgré une légère réduction de leur efficacité de 97% en 2006 à 90% en 2016 (199). Cependant, la DHA-PPQ est aussi largement utilisée depuis 2012. L'AS-MQ est aussi distribué en moindre proportion.

La résistance aux CTA n'est pas un problème au Cameroun. Plusieurs études de surveillance des marqueurs moléculaires connus pour être associés à la résistance aux principales molécules antipaludiques ont été réalisées ces dernières années. Ces mutations et les antipaludiques dont elles affectent le niveau de résistance ont été listées dans le tableau 2 (198). La plupart des polymorphismes répertoriés au Cameroun ces vingt dernières années ont été identifiés dans les gènes *Pfcr1* (associés à la tolérance à la CQ, AQ et LM), *Mdr1* (associés à la tolérance à l'AQ, CQ, MQ et LM), et *Dhfr/Dhps* (associés à la tolérance à la SP). Ces dernières années, les polymorphismes associés à la sensibilité à la CQ semblaient ré-émerger en raison des nouvelles politiques de traitement adoptées au Cameroun depuis 2004 (208,209). Les marqueurs de résistance à la SP semblent quant à eux persister, cette combinaison étant toujours utilisée pour le traitement préventif intermittent des femmes enceintes (210).

Gene	Drugs affected by gene mutations	Mutations detected in Cameroon	Sites reporting drug resistance
<i>pfcr1</i>	CQ, AQ, LM	K76T, M74I, N75E, K76 T, Q271K, I356K	Mutengene, Ebolowa, Yaoundé, Bertoua, Douala, Kyé-Ossi, Ngaoundéré, Garoua
<i>pfdhfr</i>	SP	N511, C59R, S108N	Yaoundé, Mont-Cameroon, Ngaoundéré, Garoua
<i>pfdhps</i>	SP	K142N, I431V, S436A, A581G, A613S, K540E, A437G	Yaoundé, Mont-Cameroon, Mutengene, Garoua
<i>pfmdr-1</i>	AQ, CQ, LM, MQ	N86Y, Y184F, D1246Y	Mutengene, Yaoundé, Garoua
<i>pfkelch13</i>	Artemisinine	K189T ^a	Mont-Cameroon

Tableau 2 : Prévalence des principales mutations associées à la résistance aux molécules antipaludiques ces dernières années au Cameroun.

(Antonio-Nkondjio *et al.* 2019)

La possible émergence de la résistance à l'ART en Afrique suscite aujourd'hui l'inquiétude et nécessite une surveillance accrue. De nombreux travailleurs venus d'Asie du Sud-Est ont immigré en Afrique ces dernières années et pourraient propager la résistance à l'ART (143). Il a récemment été montré que les isolats cliniques asiatiques résistants à l'ART pouvaient aussi bien être transmis par les espèces d'anophèles vectrices africaines que par les espèces vectrices asiatiques (211). Cependant, plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans le gène *K13* sans jamais être associés à une baisse de la sensibilité à l'ART *in vitro* par RSA (144,147,212). La résistance à l'ART en Afrique pourrait néanmoins émerger à travers d'autres gènes de résistance encore inconnus (213).

L'efficacité des CTA au Cameroun peut s'expliquer par la forte proportion de patients présentant une immunité partielle contre le parasite, et qui par conséquent éliminent mieux les parasites résistants. La poly-clonalité des souches camerounaises pourrait aussi ralentir la sélection de parasites résistants. Le grand nombre de CTA circulant au Cameroun permet aussi aux parasites d'être exposés à une grande variété de molécules antipaludiques, ralentissant ainsi le développement des résistances. Le nombre de cas de paludisme et la mortalité engendrée restent cependant très élevés au Cameroun et ont même augmenté depuis 2016. Plusieurs facteurs comme le nombre important de médicaments contrefaits circulant dans le pays, la résistance des anophèles aux insecticides, et l'accès restreint aux stratégies anti-vectorielles et aux traitements dans certaines régions reculées ou en conflit politique, peuvent expliquer ces chiffres.

La PQ faiblement dosée n'a pas été ajoutée aux CTA de première ligne utilisées au Cameroun. La question de l'utilisation de la PQ se pose en effet dans les zones de forte transmission, compte tenu de la grande proportion d'infections asymptomatiques qui ne sont pas traitées.

IV. NOUVELLES OPTIONS THÉRAPEUTIQUES

Tous les composés antipaludiques utilisés dans les CTA de première ligne ont été synthétisés au cours du XXème siècle. *P. falciparum* a développé des résistances à la plupart de ces molécules. Il est donc important de trouver de nouveaux composés capables de remplacer les traitements de première ligne actuels dans le cas où ils viendraient à perdre en efficacité. Le Cambodge, zone de multi-résistance, nécessite une surveillance particulière et un renouvellement fréquent des molécules antipaludiques. Le développement de plateformes de tests à haut débit ces dernières années a permis la découverte de nombreuses molécules prometteuses, principalement coordonnée par Medecine for Malaria Ventures (MMV). Le développement de ces molécules, de leur synthèse à leur disponibilité sur le marché pharmaceutique, dure plus de 10 ans. La sûreté des molécules pour les patients et leur efficacité sur *Plasmodium* doivent au préalable être prouvées au cours de différentes études cliniques (figure 17).

A. Molécules à action rapide : les remplaçants de l'artémisinine

Une attention particulière a été apportée au développement de molécules capables de remplacer l'ART. Certaines de ces molécules, les ozonides, présentent un mécanisme d'action similaire à celui de l'ART, mais avec une demi-vie beaucoup plus longue (23 heures pour OZ439) (214). L'OZ439 est actuellement testé cliniquement en Afrique et en Asie du Sud-Est (215,216). Lors de ces études, l'OZ439 a été administré en dose unique (contrairement à l'ART qui est délivrée en trois doses), facilitant ainsi la prise du traitement par les patients. La mutation C580Y dans le gène *K13* ne causait pas de résistance croisée entre l'OZ439 et l'ART (217,218), tandis que la mutation R539T conférait une résistance croisée partielle (217–220). En revanche, une forte résistance croisée entre l'ozonide OZ277 et la DHA a été observée. L'utilisation de l'OZ277 en combinaison avec la PPQ a été validée pour usage clinique en Inde. Étant donné la présence de souches présentant un délai de clairance après traitement à l'ART associées à des mutations dans *K13* en Inde, une attention particulière devrait être apportée à la surveillance de ce traitement (141).

D'autres molécules visant à remplacer l'ART présentent un tout nouveau mécanisme d'action. KAE609 est l'une des plus avancées, et présente la durée de clairance parasitaire la plus courte jamais observée (221). Elle bloque aussi la transmission des formes sanguines au moustique, et ne semble pas induire de dormance parasitaire contrairement à l'ART (222). KAF156 présente aussi un nouveau mécanisme d'action et serait active sur tous les stades de *P. falciparum*. Cependant, les résistances à KAE609 (82) et KAF156 (223,224) ont pu être induites *in vitro* et des mutations impliquées dans ces résistances ont déjà été identifiées. Ces deux molécules sont testées cliniquement en dose unique.

B. Molécules à action prolongée

Deux des nouvelles molécules partenaires en cours d'essai clinique ont été testées au Cambodge. Les résultats sont présentés dans la partie « travaux de recherche » de cette thèse :

- *La pyronaridine (PYR):*

Cette molécule a été développée en 1970 en Chine et y a été utilisée en monothérapie pendant environ 30 ans. La PYR est un dérivé de benzonaphthyridine. Sa demi-vie est d'environ 14 jours (225). La PYR est utilisée en combinaison avec l'artésunate (AS-PYR, Pyramax®). Cette combinaison a été co-développée par MMV et Shin Poong pharmaceutical (Corée du Sud). C'est la seule nouvelle CTA à avoir été approuvée par l'Agence Européenne du Médicament (article 58) (226). L'AS-PYR est indiqué pour le traitement des paludismes non compliqués à *P. falciparum* et *P. vivax*. Son utilisation est aujourd'hui enregistrée dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne et d'Asie du Sud-Est (226). Plusieurs études cliniques réalisées en Afrique et en Asie ont confirmé l'efficacité et la sûreté de l'AS-PYR (227–230). La résistance de *Plasmodium* à l'AS-PYR n'a pas encore été observée.

- *La ferroquine (FQ):*

C'est une amino-4-quinoléine de troisième génération synthétisée dans les années 1990, et dérivée de la CQ par ajout d'un groupement ferrocène. Le mécanisme d'action de la FQ par inhibition de la détoxification de l'hème est similaire à celui de la CQ (231). L'efficacité de la FQ a pourtant été démontrée sur des souches CQ-résistantes (232). De plus, les tentatives d'induction de la résistance

à la FQ *in vitro* ont échoué (233). La demi-vie de la FQ est de 16 à 31 jours. Cette molécule vise à être utilisée comme drogue partenaire. Plusieurs essais cliniques ont été conduits en testant la FQ en combinaison avec l'AS. Cette association a été montrée efficace en Afrique (234,235). L'utilisation de la FQ en combinaison l'OZ439 est en cours d'essai clinique au Vietnam.

C. Les triple-CTA

De nouvelles CTA composées de molécules antipaludiques développées au cours du siècle dernier sont aussi en cours d'essai clinique. Parmi elles, on retrouve les triple-CTA, composées d'un dérivé de l'ART associé à deux drogues partenaires de longue demi-vie. Cette tri-formulation a pour but de limiter l'apparition des résistances. Une étude clinique visant à comparer l'efficacité de triple-combinaisons (AL-AQ et DHA-PPQ-MQ) à celle de CTA de référence (AL et DHA-PPQ) est actuellement en cours (étude NCT02453308, clinicaltrials.gov).

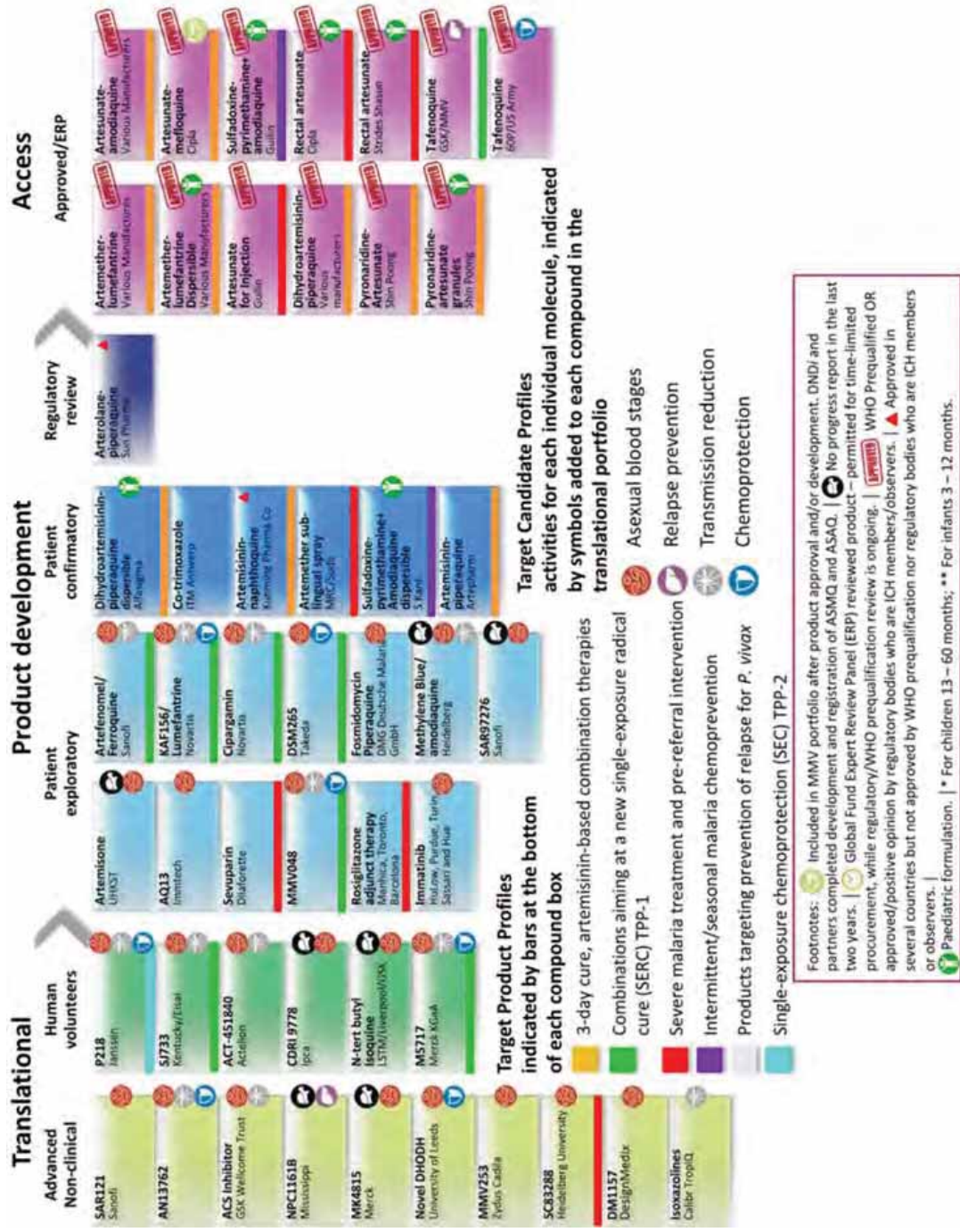


Figure 17 : Molécules antipaludiques dont le développement est soutenu par MMV. Les différents stades de développement pharmaceutique, type de traitement et activité sont indiqués pour chaque molécule. (Adapté de Tse et al. 2019 et <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-project>)

PARTIE 2 :

Travaux de recherche

Objectifs : La première partie de ce travail décrit l'épidémiologie des résistances de *P. falciparum* aux principaux composés antipaludiques utilisés au cours des dix dernières années au Cambodge et au Cameroun. La deuxième partie a étudié l'efficacité de nouvelles options thérapeutiques envisageables au Cambodge, potentiellement capables de remplacer les traitements de première ligne actuels en cas d'augmentation des échecs thérapeutiques. Enfin, une dernière partie a visé à mieux comprendre les mécanismes biologiques de résistance à l'ART des isolats du Cambodge et les facteurs additionnels à *K13* impliqués dans cette résistance.

I. ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX CTA AU CAMBODGE ET AU CAMEROUN

A. Émergence de la résistance à l'artésunate-méfloquine en combinaison avec une faible dose de primaquine au Cambodge

1. Introduction

L'AS-MQ associé à une faible dose de PQ est le traitement de première intention figurant depuis 2016 dans le schéma thérapeutique au Cambodge (1). Ce traitement avait déjà été utilisé de 2001 à 2012, mais l'augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques associée à l'émergence de résistances à l'ART et à la MQ avait conduit à son remplacement par la DHA-PPQ en 2012 (59,68). La proportion d'échecs thérapeutiques après traitement à la DHA-PPQ a par la suite graduellement augmenté pour atteindre près de 50%, notamment dans la province de Pursat (Ouest du Cambodge). Durant cette même période, un retour de la sensibilité à la MQ a pu être observé, encourageant la réintroduction de l'AS-MQ comme traitement de première ligne en 2016 (60,64,162).

Les travaux présentés dans cette partie s'inscrivent dans une logique de surveillance clinique, moléculaire et *in vitro* de l'efficacité de l'AS-MQ ces dernières années au Cambodge. Les marqueurs moléculaires de résistance découverts au cours de la dernière décennie représentent un outil de surveillance majeur de l'évolution des résistances. Le gène *K13*-muté a été identifié comme le principal

marqueur moléculaire de résistance à l'ART (45,120). La résistance à la MQ a été associée à l'amplification du gène *Mdr1* (167). Enfin, l'amplification des gènes *Pm2* et *Pm3* et différents polymorphismes du gène *Crt* ont été associés à la résistance à la PPQ (150,151,158). L'évolution de ces différents marqueurs moléculaires a été analysée pour un grand nombre d'isolats de *P. falciparum* collectés entre 2016 et 2019, en association avec l'efficacité clinique du traitement. Une étude phénotypique de la sensibilité à l'ART, PPQ, et MQ *in vitro* a aussi été réalisée. Ce travail a aussi eu pour but de suivre la dynamique spatio-temporelle des résistances aux antipaludiques au Cambodge.

2. Méthodes

a. Conception de l'étude et participants

- **Descriptif des études.** Quatre études d'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ ont été conduites entre 2016 et 2019 au Cambodge. Celle de 2019 étant toujours en cours, les données décrites le seront seulement pour les échantillons déjà reçus et analysés au moment de la rédaction de ce manuscrit. Le nombre de patients et les sites d'inclusion ont été décrits pour chaque étude dans le tableau 3 et la figure 18. L'étude 20HC a été réalisée en 2017 dans l'unique objectif de réaliser une analyse moléculaire des marqueurs de résistance. Les données moléculaires et phénotypiques des études d'efficacité thérapeutique de l'ASAQ, DHA-PPQ et AS-PYR ont aussi été utilisées pour ce travail. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le « National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control » (Centre National de Malariologie [CNM], Phnom Penh, Cambodge) et l'OMS.

Période	Sites	Nombre de participants	Collection de sang pour étude moléculaire	Collection de sang pour étude phénotypique
Études d'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ				
Sep 2016 - Jan 2017	Kampong Speu	TOTAL = 68	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
Nov 2017 - Fev 2018	Kampong Speu	56	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Pursat Stung Treng	51 60 TOTAL = 167		
Sep 2018 - Jan 2019	Kratie	24	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Mondulkiri	44		
	Ratanakiri	53 TOTAL = 121		
Sep 2019 - Dec 2019	Kampong Speu	35	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Kratie	8		
	Mondulkiri	1		
	Pursat	16		
	Ratanakiri	52 TOTAL = 112		
Étude moléculaire				
2017 (20HC)	Kampong Cham	56	Oui, gouttes de sang séché	non
	Kampong Som	52		
	Oddar Mancheay	8		
	Pursat	9		
	Mondulkiri	161		
	Ratanakiri	72		
	Stung Treng	175 TOTAL = 533		
Autres études d'efficacité thérapeutiques (pour données moléculaires et phénotypiques)				
2016 (DHA-PPQ)	Ratanakiri	61	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Stung Treng	47 TOTAL = 108		
2016 (ASAQ)	Mondulkiri	31	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Pursat	29		
	Siem Reap	3 TOTAL = 63		
2017-2019 (AS-PYR)	Kampong Speu	62	Oui, sang total (-80°C)	Oui, sang total (azote liquide)
	Pursat	42		
	Mondulkiri	60		
	Ratanakiri	59 TOTAL = 223		

Tableau 3 : Descriptif des études cliniques, moléculaires et phénotypiques effectuées au Cambodge entre 2016 et 2019.

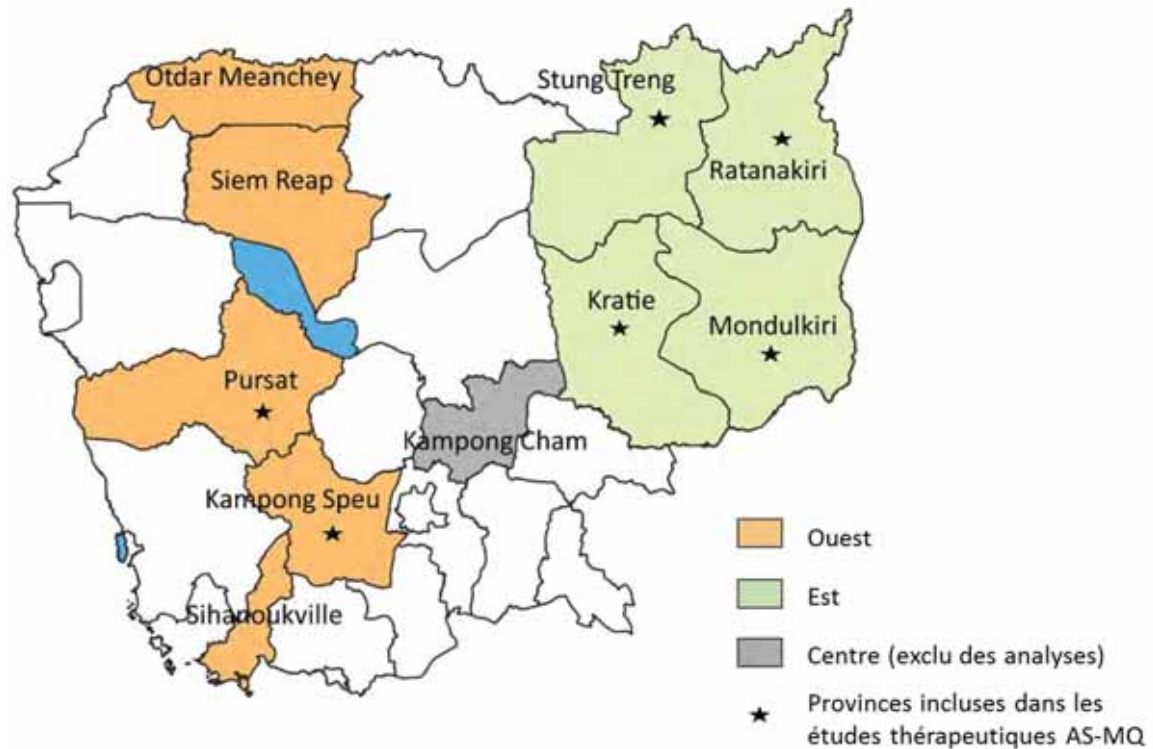


Figure 18 : Carte du Cambodge indiquant les provinces incluses dans les études cliniques, moléculaires et *in vitro*.

- Recrutement des patients.** Tous les patients inclus ont donné leur consentement écrit. Une autorisation parentale a été obtenue pour les enfants âgés de 12 ans et moins. Les patients éligibles étaient âgés de plus de 7 ans, et présentaient une mono-infection à *P. falciparum* (entre 500 et 250000 parasites asexués par μL de sang) confirmée par microscopie. Les patients ont présenté de la fièvre au cours des 24 dernières heures et étaient capables d'ingérer un traitement oral. Les femmes non mariées âgées de 12 à 18 ans, et les femmes enceintes et allaitantes ont été exclues des études. Toutes les femmes pouvant potentiellement être enceinte ont effectué un test de grossesse. Les autres critères d'exclusion ont été : un paludisme sévère, une malnutrition sévère, des conditions fébriles dues à une autre infection, une infection chronique, l'utilisation de médicaments pouvant interférer avec la pharmacocinétique des antipaludiques administrés, ou un précédent recueil d'hypersensibilité à l'AS ou à la MQ.

b) Traitement

L'AS-MQ (Artesunate/Mefloquine 100/200mg, fixed dose combination, Cipla, Mumbai, Inde) a été administré sous supervision médicale une fois par jour pendant trois jours. Les doses journalières ont été déterminées en fonction du poids pour atteindre 4mg/kg/jour d'AS, et 8mg/kg/jour de MQ. La PQ a été administrée en dose unique de 15 mg (0,25 mg/kg) le premier jour du traitement.

c) Procédure

Les patients inclus ont subi un examen clinique et leurs précédents traitements médicamenteux ont été répertoriés. Tous les patients ont été suivis à jour 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 et 42. La parasitémie et l'espèce de *Plasmodium* ont été identifiées par examen de gouttes épaisses colorées au Giemsa, à chaque visite pendant et après traitement jusqu'à ce que la parasitémie du patient soit négative. Les patients présentant une parasitémie positive à l'issue du traitement (formes asexuées) ont reçu un traitement de seconde intention. Les patients ayant développé un paludisme sévère durant cette période ont été traités par quinine-tétracycline, en accord avec les recommandations nationales.

Un échantillon sanguin a aussi été collecté avant traitement (jour 0) et au jour de l'échec clinique. Par la suite une analyse des génotypes *Msp1*, *Msp2* et *Glurp* comparant la souche initiale à celle collectée lors de la résurgence de l'infection a été réalisée afin de catégoriser ces évènements cliniques en réinfection ou recrudescence (échec clinique) (236).

d) Surveillance moléculaire

Le gène *K13* a été séquencé afin d'identifier les mutations associées à la résistance à l'ART, selon le protocole précédemment décrit (120). Les nombres de copies des gènes *Pm2/Pm3* (nommé *Pm2*) et *Mdr1* associés respectivement à la résistance à la PPQ et à la MQ ont été déterminés par PCR quantitative suivant le précédent protocole avec modification de la température d'hybridation à 63°C (150). Les gènes ont été considérés amplifiés pour un nombre de copies >1,5. Les séquences du gène *Crt* ont également été obtenues pour certains échantillons collectés en 2017 et 2018 par séquençage du génome complet (en collaboration avec le Dr. Frédéric Arieu, Institut Cochin, Paris), afin d'identifier les mutations associées à la résistance à la PPQ.

e) Evaluation de la sensibilité à la DHA, MQ et PPQ *in vitro*

Le sang des patients inclus a été collecté en tubes acide-citrate-dextrose (ACD) avant traitement, et cryo-préservé dans les 48 heures après réception à l'Institut Pasteur du Cambodge. Les isolats ont ensuite été décongelés et adaptés en culture selon les méthodes décrites (116). La souche de référence 3D7 (sensible à la DHA, à la PPQ et à la MQ, obtenue par le Malaria Research and Reference Reagent Resource center [MR4]) a été cultivée suivant les mêmes conditions. Les susceptibilités à l'ART et à la PPQ de certains des échantillons collectés ont été évaluées par RSA^{0-3h} et PSA^{0-3h} respectivement, comme précédemment décrit (60,116). Brièvement, les rings 0-3h post-invasion (p.i) ont été exposés à 700 nM de DHA ou 200 nM de PPQ pendant respectivement 6 ou 48 heures, puis maintenues 66 ou 24 heures dans un milieu sans antipaludique. La proportion de parasites viables a ensuite été énumérée sur un total de 10000 globules rouges via frottis sanguin colorés au Giemsa. Le pourcentage de survie après exposition à la DHA et à la PPQ a été déterminé en fonction de la survie observée dans le contrôle sans médicament.

La susceptibilité à la MQ a été évaluée par test isotopique d'incorporation de [G-H³]-Hypoxanthine, selon la méthode déjà décrite (116). Les concentrations inhibitrices (CI₅₀) ont été déterminées en utilisant le site <http://www.antimalarial-icestimator.net>.

3. Résultats

a) Efficacité thérapeutique de l'AS-MQ au Cambodge de 2017 à 2019

L'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ a été étudiée au cours des quatre études précédemment décrites (tableau 3). Les échecs cliniques (recrudescences) ont été identifiés par génotypage. Sur un total de 468 échantillons collectés entre 2016 et 2019, seulement 3 échecs cliniques ont été observés. Deux des échecs ont été collectés dans la province de Pursat (Ouest) et un dans la province du Ratanakiri (Est). L'efficacité moyenne de ces études était donc de 99,4% (figure 19, tableau 4). Les données d'efficacité clinique, ainsi que les données moléculaires et *in vitro* des souches recrudescences ont été listées dans le tableau 4. Les souches recrudescences présentaient les

mutations R539T et Y493H dans le gène *K13*. Deux d'entre elles présentaient plusieurs copies du gène *Mdr1* au jour de l'échec, associée à une baisse de susceptibilité à la MQ *in vitro*.

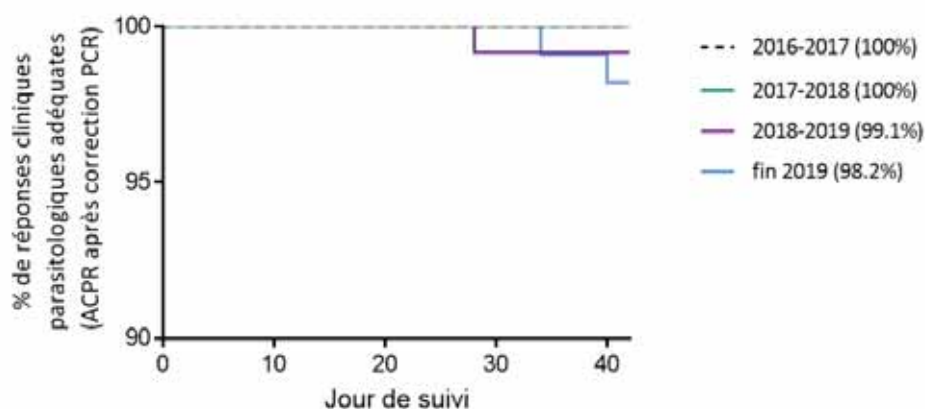


Figure 19 : Efficacité clinique de l'AS-MQ de 2016 à 2019. Les probabilités de réponses cliniques et parasitologiques adéquates ont été mesurées par Kaplan-Meier pour les 4 études d'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ effectuées entre 2016 et 2019. Les courbes de survie ont été comparées par test de Log-Rank (Mantel-Cox), et considérées statistiquement significatives pour une valeur $P < 0,05$. Aucune des différences entre les courbes de survie des années 2016-2017, 2017-2018, 2018-2019 et 2019-2020 n'apparaît significative.

Données cliniques				
Nombre d'échantillons		468		
Nombre d'échecs cliniques (recrudescences)		3		
Nombre de réinfections		5		
Efficacité (%)		99,4%		
		Échec 1	Échec 2	Échec 3
Souches recrudescences	Site de collection	Ratanakiri	Pursat	Pursat
	Données moléculaires des échecs cliniques			
	Polymorphisme <i>K13</i>	R539T	Y493H	Y493H
	Nombre de copies <i>Mdr1</i> avant traitement (jour 0)	4	1	2
	Nombre de copies <i>Mdr1</i> après traitement (jour X)	4	2	2
	Nombre de copies <i>Pm2</i>	1	1	1
	Données phénotypiques des échecs cliniques			
	RSA (% de survie) à jour 0	45	0,9	2,7
	PSA (% de survie) à jour 0	0	0,5	2,5
	CI ₅₀ MQ (nM) à jour 0	107,5	47,0	72,3

Tableau 4 : Efficacité thérapeutique de l'AS-MQ entre 2017 et 2019 au Cambodge. Les marqueurs moléculaires des souches résistantes, ainsi que les données de susceptibilité *in vitro* à l'ART, PPQ et MQ ont été précisés pour les souches recrudescences (seuils de résistance : 1% de survie pour la DHA, et 10 nM de CI₅₀ pour la PPQ).

b) Evolution des marqueurs moléculaires de résistance depuis 2016

Les polymorphismes du gène *K13*, ainsi que le nombre de copies des gènes *Mdr1* et *Pm2* ont été déterminés pour 1251 échantillons de *P. falciparum* collectés dans différentes provinces cambodgiennes entre 2016 et 2019 (voir figure 18). Les échantillons provenaient de toutes les études décrites dans le tableau 3 (matériels et méthodes).

Évolution des polymorphismes du gène K13.

- *Allèle sauvage* : Entre 2016 et 2018, la proportion d'échantillons présentant un allèle *K13*-sauvage a augmenté à l'Ouest du Cambodge (de 3% à 27%), ainsi qu'à l'Est (de 18 à 43%). La proportion de souches *K13*-sauvages a diminué en 2019 pour atteindre 11% à l'Ouest et 37% à l'Est (figure 20, vert) ;
- *Allèle C580Y* : En 2016, 97% des échantillons provenant de l'Ouest présentaient la mutation C580Y dans le gène *K13* (*K13*-C580Y), contre 81% à l'Est. En 2019, la proportion d'isolats *K13*-C580Y a diminué jusqu'à 61% à l'Ouest et à l'Est (figure 20, rouge) ;
- *Allèles minoritaires* : La proportion des polymorphismes minoritaires du gène *K13* (*K13*-R539T, *K13*-Y493H et *K13*-P553L) a augmenté de 0 à 29% entre 2016 et 2019 à l'Ouest, mais a en revanche diminué de 2 à 0% à l'Est. En 2016, seule une souche *K13*-R539T et une souche *K13*-P553L ont été collectées à l'Est du Cambodge. En 2017-2018, 8 mutants *K13*-R539T ont été collectés, exclusivement à l'Est. De 2017 à 2019, 32 mutants *K13*-Y493H ont été collectés, exclusivement à l'Ouest (figure 20, bleu).

Évolution de l'amplification des gènes Pm2/3. La proportion de souches *K13*-sauvages présentant une amplification du gène *Pm2* est passée de 1% en 2016 à 10% en 2018 à l'Ouest, et a diminué à 4% en 2019. À l'Est, en revanche, la proportion des souches *K13*-sauvage *Pm2*-amplifiées est toujours restée inférieure à 5% de 2016 à 2019 (figure 20, hachuré noir). La proportion de souches *K13*-C580Y *Pm2*-amplifiées a diminué de 60% en 2016 à 18% en 2019 à l'Ouest du Cambodge. À l'Est, elle a diminué de 62% en 2016 à 4% en 2019. En 2017, 3% des isolats *K13*-Y493H collectés à l'Ouest présentait une amplification du gène *Pm2* contre pour 0% en 2019.

Évolution de l'amplification du gène Mdr1. Les parasites *K13*-sauvages ne présentaient pas d'amplification du gène *Mdr1*. La proportion de souches *K13*-C580Y présentant une amplification du gène *Mdr1* est passée de 0% en 2016 à 4% en 2019 à l'Ouest, et de 0 à 37% à l'Est. La proportion de parasites *K13*-Y493H présentant une amplification du gène *Mdr1* est passée de 0% à 11% entre 2017 et 2019 à l'Ouest cambodgien (absence de mutants minoritaires à l'Est) (figure 20, hachuré rose).

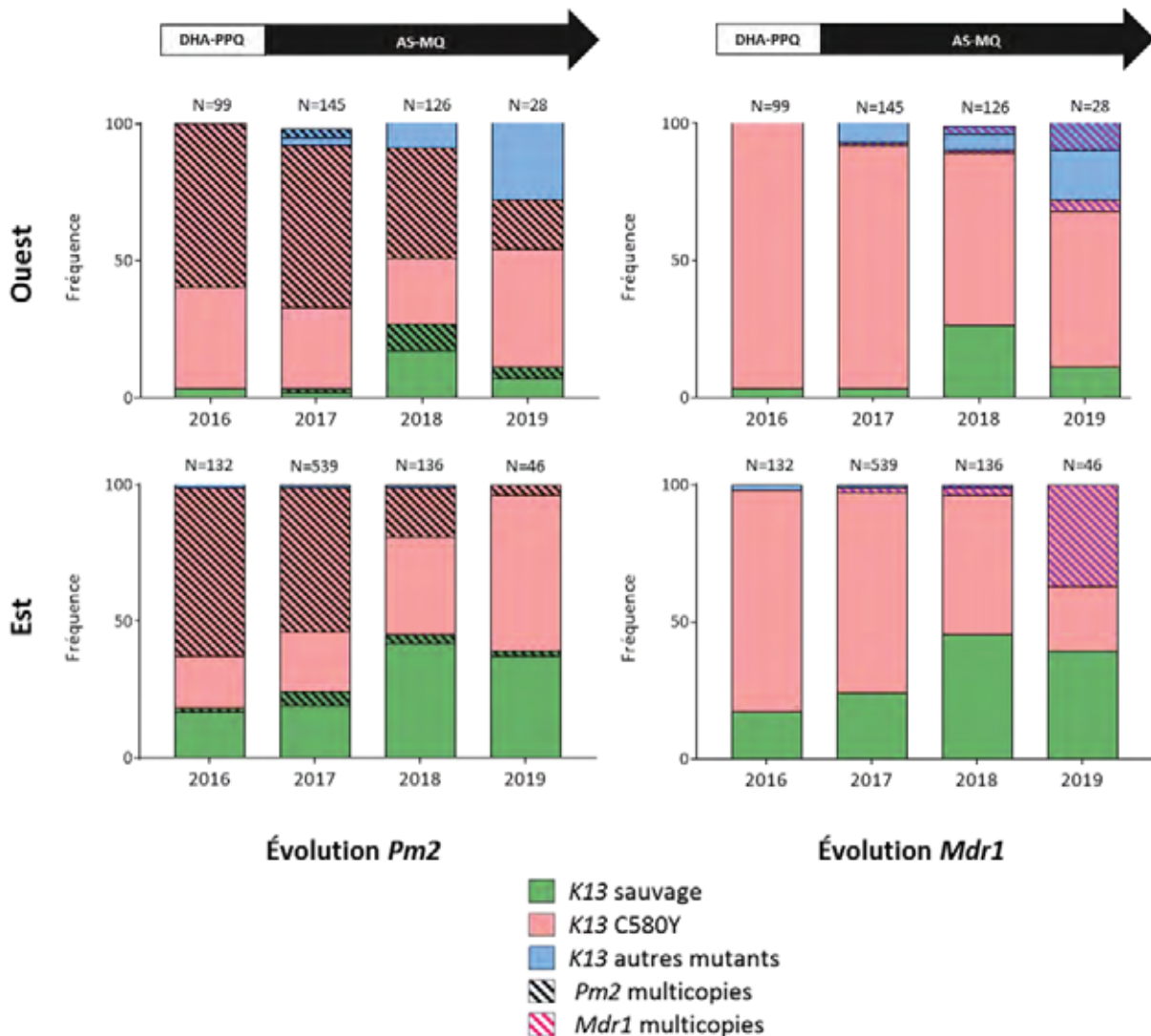


Figure 20 : Évolution des principaux marqueurs moléculaires de résistance de 2016 à 2019 à l'Est et à l'Ouest du Cambodge (voir carte dans la partie méthodes). Les proportions des différents polymorphismes du gène *K13*, ainsi que l'amplification des gènes *Mdr1* et *Pm2/3*, ont été déterminées pour 1251 échantillons collectés entre 2016 et 2019.

Évolution des polymorphismes du gène Crt de 2017 à 2018. Les principaux polymorphismes du gène *Crt* précédemment associés à la résistance à la PPQ ont été déterminés par séquençage du génome complet pour 95 souches (49 collectées en 2016 et 46 collectées en 2017, figure 21). Le séquençage du gène *Crt* des souches collectées en 2018 et 2019 est en cours de mise au point par méthode Sanger. Les 95 isolats présentaient un fond génétique Dd2 (mutations CVIET dans le gène *Crt* associées à la résistance à la CQ). Les principales mutations associées à une baisse de susceptibilité à la PPQ étaient : T93S, H97Y, F145I, I218F, M343L et G353V (figure 21). Les souches présentant seulement les polymorphismes associés au fond génétique Dd2 ont été nommées *Crt*-Dd2.

La proportion de souches *Crt*-Dd2 était plus importante à l'Est (40% en moyenne contre 20% à l'Ouest). La proportion des souches *Crt*-Dd2 a diminué de 46% en 2016 à 35% en 2017 à l'Est du Cambodge. Certains de ces allèles du gène *Crt* ont montré des changements importants dans leur distribution entre 2016 et 2017 : à l'Ouest, la proportion de l'allèle H97Y a diminué de 45 à 17% tandis que celle du mutant G353V a augmenté de 15 à 44%. Le mutant M343L a disparu en 2017. À l'Est, le mutant I218F est apparu en 2017 et la proportion de souches T93S a légèrement diminué. Pour la grande majorité des isolats collectés, les mutations dans le gène *Crt* étaient associées à l'amplification du gène *Pm2*.

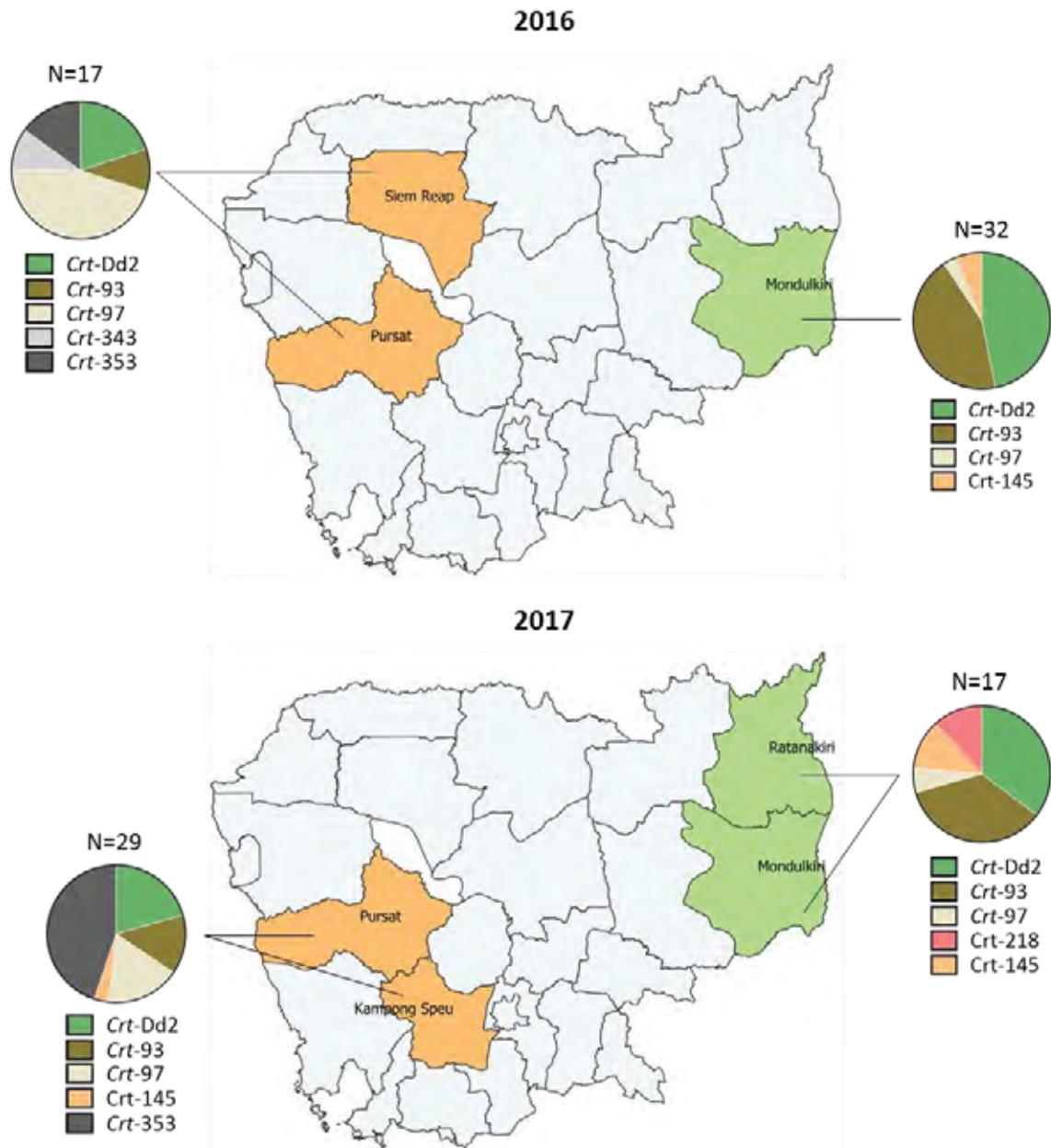


Figure 21 : Evolution des principaux polymorphismes du gène *Pfcrt* entre 2016 et 2017 au Cambodge. Les génomes complets de 49 isolats collectés en 2016 et 46 isolats collectés en 2017 ont été séquencés afin de déterminer les principaux polymorphismes du gène *Pfcrt* impliqués dans la résistance à la PPQ. La distribution de ces polymorphismes à l'Est et à l'Ouest cambodgien a été comparée entre 2016 et 2017.

c) Evolution du phénotype de résistance à la PPQ et MQ de 2016 à 2019

Les isolats testés ont été collectés lors des quatre études d'efficacité de l'AS-MQ décrites précédemment, ainsi qu'au cours d'autres études cliniques menées au Cambodge entre 2016 et 2019 (DHA-PPQ en 2016, Pyramax® en 2017-2018). La figure 22 décrit l'évolution de la résistance à la PPQ

et à la MQ de 2016 à 2019. Les isolats collectés en 2016 étaient significativement plus résistants à la PPQ (médiane des PSA= 39,4% de survie [interquartile range (IQR) : 14 – 75]) que ceux collectés en 2019 (médiane des PSA = 1,2% [0 – 25,6]). En revanche, la susceptibilité des isolats à la MQ a significativement augmenté durant cette période, passant d'une CI_{50} médiane de 14,51 nM [IQR : 10,61 – 26,56] en 2016, à 65,1 nM [45,04 – 82,41] en 2019.

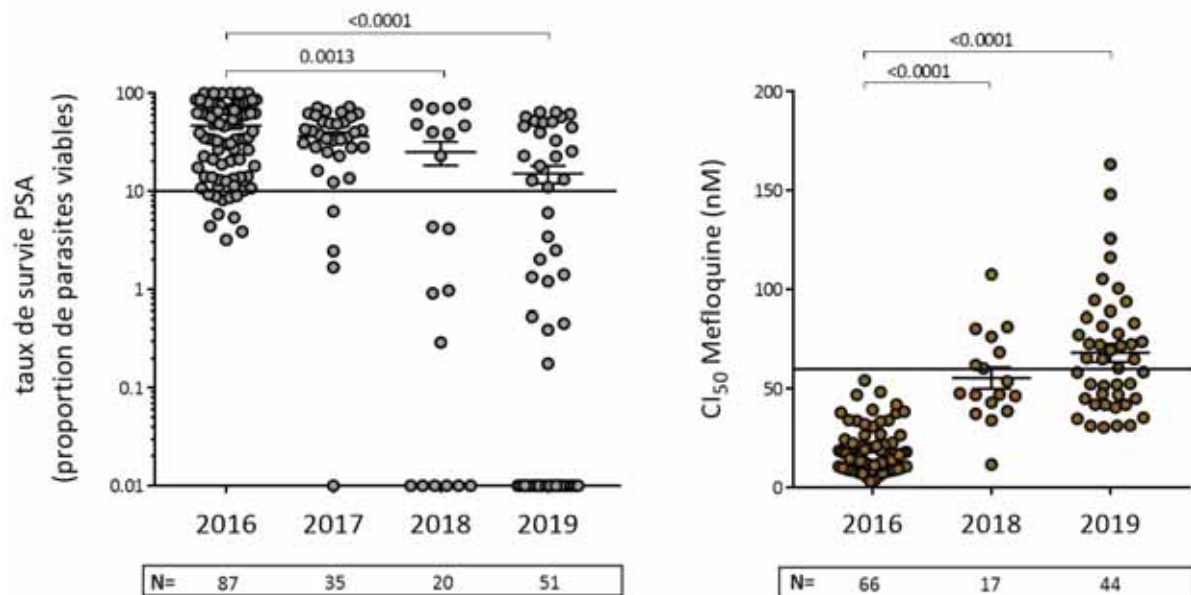


Figure 22 : Evolution de la susceptibilité à la PPQ (gauche) et à la MQ (droite) des isolats collectés entre 2016 et 2019. Le seuil de résistance à la PPQ a été fixé à 10 nM, et celui de la MQ à 60nM. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard à la moyenne (Standard Error of the Mean, SEM) pour chaque groupe. Les groupes ont été comparés deux à deux par test de Mann-Whitney. Les valeurs P sont indiquées entre crochet, et considérées significatives si inférieures à 0,1.

d) Impact du génotype sur le phénotype de résistance des isolats

L'impact des différents génotypes de résistance sur la susceptibilité des isolats collectés de 2016 à 2019 a ensuite été étudié (figure 23-24).

Polymorphismes *K13* versus susceptibilité à la DHA (figure 23). Les isolats *K13*-sauvages avaient un RSA médian de 0,01% [IQR : 0 – 0,18], tandis que les mutants C580Y, R539T et Y493H présentait des RSA médians de 14% [IQR : 7,4 – 19,7], 45,9% [IQR : 24 – 58,9] et 2% [IQR : 1,2 – 3,2] respectivement. 4,3% des isolats *K13*-sauvages testés présentaient un RSA supérieur au seuil de résistance, fixé à 1% (figure 23, A). Les polymorphismes du gène *K13* avaient un impact significatif sur la survie des isolats

collectés au Cambodge entre 2016 et 2019 après traitement des patients infectés à l'AS-MQ. Les parasites présentant les allèles minoritaires de *K13* (R539T et Y493H) avaient statistiquement plus de risque de causer un échec clinique ($P < 0,0001$, test de Log Rank) (figure 23, B).

Impact du génotype *K13*, *Mdr1* et *Pm2/3* sur la sensibilité des isolats à la MQ et PPQ (figure 24). Les isolats *K13*-mutants (PSA médian= 22,7% [IQR : 4 – 38,3]) étaient significativement moins susceptibles à la PPQ que les isolats *K13*-sauvages (PSA médian= 0,5% [IQR : 0 – 17,7]) ($P < 0,0001$). Inversement, les isolats *K13*-mutants (CI_{50} médiane = 42 nM [IQR : 26,5 – 52,6]) étaient plus susceptibles à la MQ que les isolats *K13*-sauvages (CI_{50} médiane = 58,3 nM [IQR : 47,1 – 65,6]) ($P = 0,0061$). L'association de l'amplification du gène *Pm2* au gène *K13* muté exacerbait la tolérance à la PPQ (PSA médian= 51,4% [IQR : 32,8 – 67,3]), et la sensibilité à la MQ (CI_{50} médiane = 14,7 nM [IQR : 10,7 – 30,5]) ($P < 0,0001$). À l'opposé, l'amplification du gène *Mdr1* associée au gène *K13*-mutant était associée à une élévation de la sensibilité à la PPQ (PSA médian= 0,01% [IQR : 0 – 1,9]), et à une baisse de sensibilité à la MQ (CI_{50} médiane = 86 nM [IQR : 73,9 – 105,2]) ($P < 0,0001$) (figure 24, A).

Les parasites présentant une amplification du gène *Mdr1* avaient statistiquement plus de risque de causer un échec clinique ($P < 0,0001$, test de Log Rank) (figure 24, B).

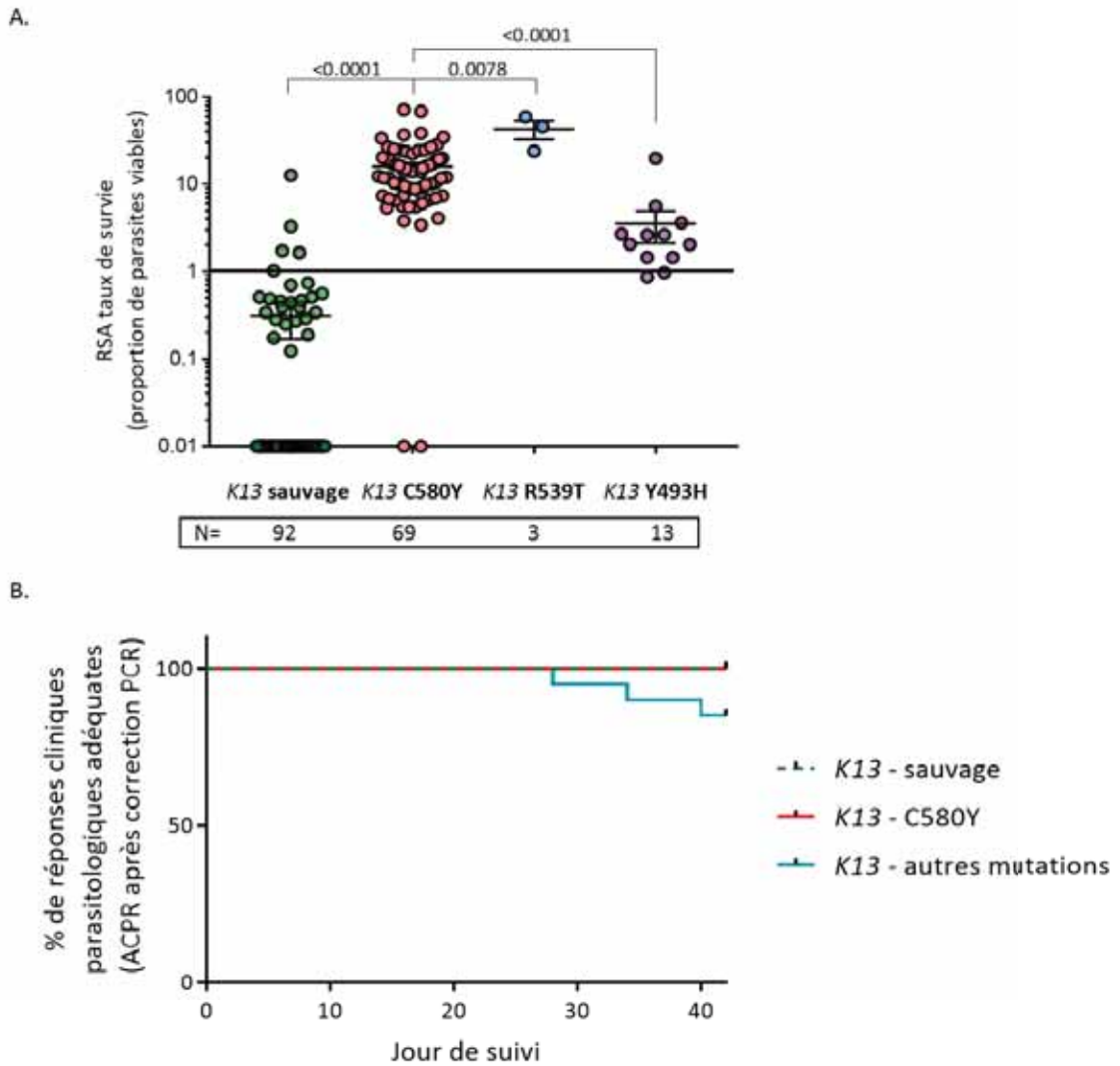


Figure 23 : Impact des différents génotypes de résistance sur la susceptibilité des isolats cambodgiens. A. Impact des principaux polymorphismes du gène *K13* observés au Cambodge de 2016 à 2019 sur la susceptibilité à la DHA. Le seuil de résistance à la DHA a été fixé à 1% de survie. Les différents groupes ont été comparés par test de Mann-Whitney et les différences considérées significatives pour des valeurs P inférieures à 0,05. B. Impact des polymorphismes du gène *K13* sur l'efficacité clinique de l'AS-MQ. Les probabilités de réponses cliniques et parasitologiques adéquates des isolats *K13*-sauvages, *K13*-C580Y et *K13*-R539T et *K13*-Y493H ont été mesurées par Kaplan-Meier pour les 4 études d'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ effectuées entre 2016 et 2019. Les courbes de survie ont été comparées par test de Log-rank (Mantel-Cox). La différence entre la courbe de survie des isolats *K13*-autres mutations et *K13*-sauvages/C580Y est significative ($P < 0,0001$).

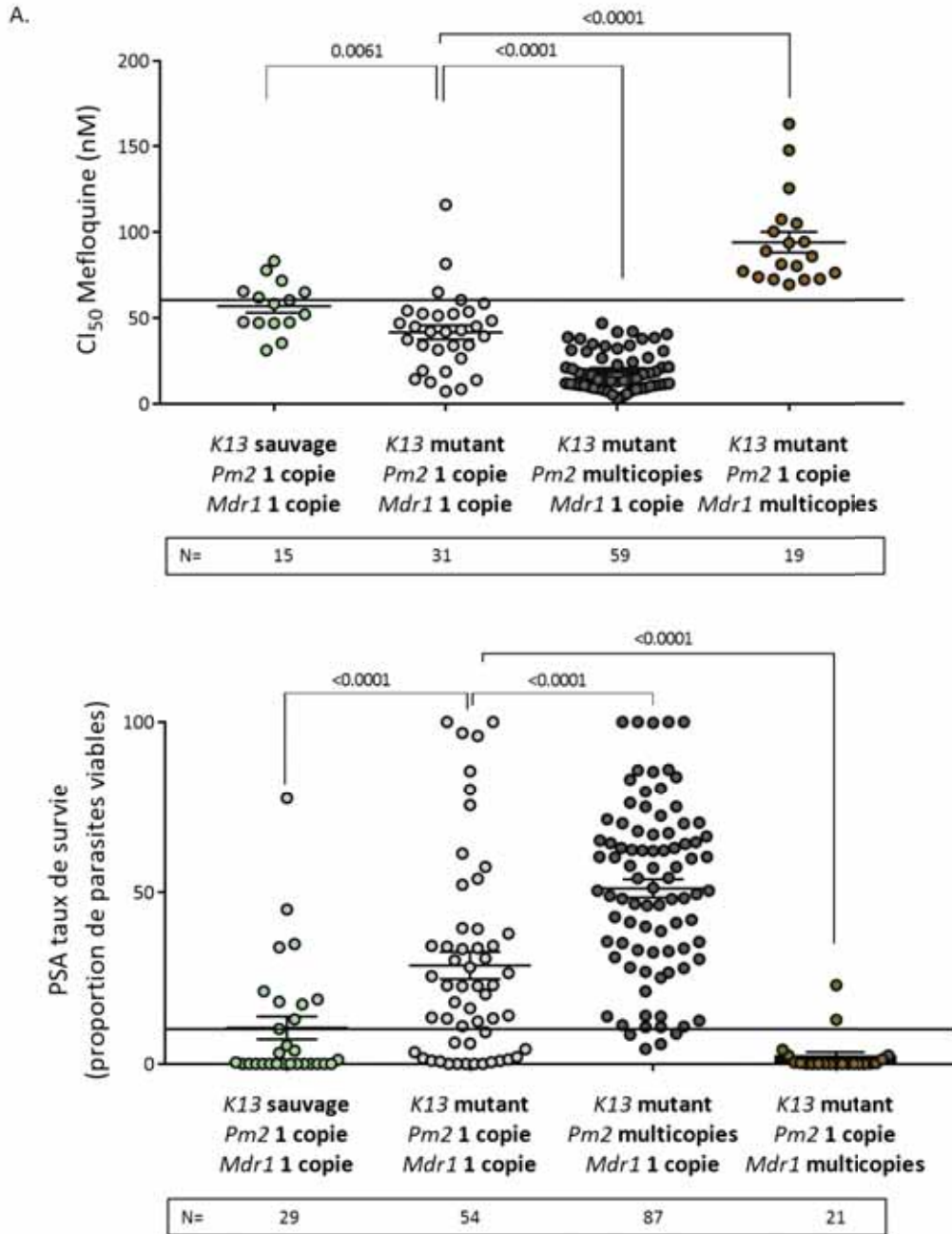


Figure 24 : A. Impact des mutations dans *K13* et du nombre de copies des gènes *Pm2* et *Mdr1* sur la susceptibilité à la MQ et à la PPQ. Les seuils de résistance (ligne noire) à la MQ et PPQ ont respectivement été fixés à 60 nM et 10% de survie. Les différents groupes ont été comparés par test de Mann-Whitney et les différences considérées significatives pour des valeurs P inférieures à 0,1.

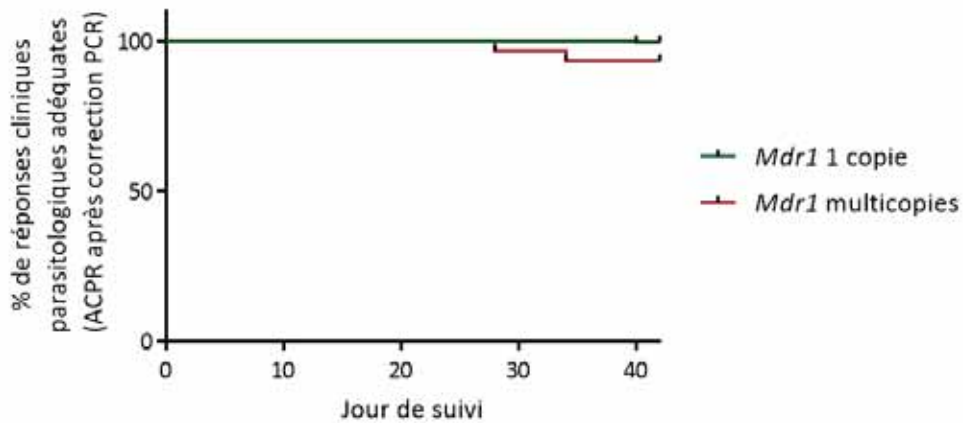


Figure 24 : B. Impact de l'amplification du gène *Mdr1* sur l'efficacité clinique de l'AS-MQ. Les probabilités de réponses cliniques et parasitologiques adéquates des isolats *Mdr1*-1 copie et *Mdr1*-multicopies ont été mesurées par Kaplan-Meier pour les 4 études d'efficacité thérapeutique de l'AS-MQ effectuées entre 2016 et 2019. Les courbes de survie ont été comparées par test de Log-rank (Mantel-Cox). La différence entre la courbe de survie des isolats présentant 1 copie ou plusieurs copies du gène *Mdr1* est significative ($P < 0,0001$).

Impact du génotype *Crt* sur la sensibilité des isolats à la MQ et PPQ (figure 25). Les mutations dans le gène *Crt* associées à la résistance à la PPQ n'ont pas montré d'impact significatif sur la susceptibilité des isolats à la PPQ et à la MQ, à l'exception de la mutation T93S qui sensibilise significativement les parasites à la MQ ($P < 0,0001$).

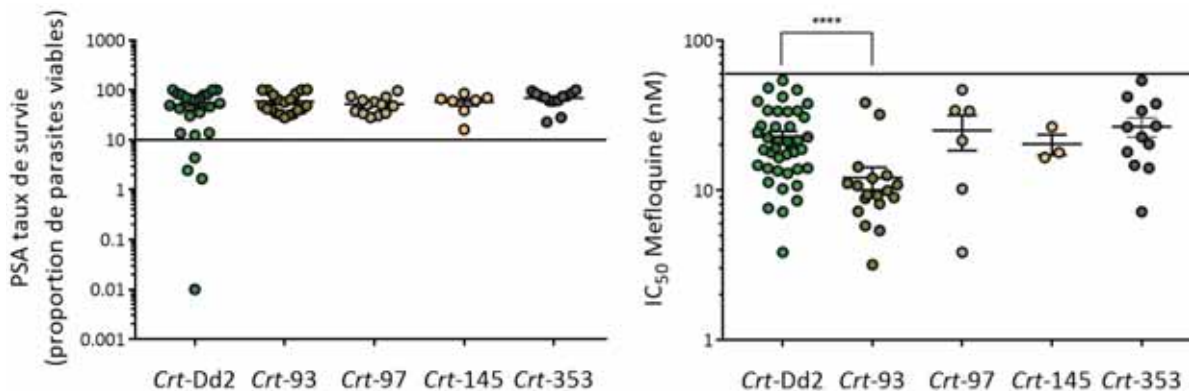


Figure 25 : Impact des polymorphismes du gène *Crt* sur la susceptibilité à la PPQ et MQ *in vitro*. Les seuils de résistance (ligne noire) à la MQ et PPQ ont respectivement été fixés à 60 nM et 10% de survie. Les groupes ont été comparés deux à deux par test de Mann Whitney, et les différences entre groupes considérées significatives pour une valeur $P < 0,05$. La susceptibilité à la MQ des isolats *Crt*-93 est significativement plus importante que celle des isolats *Crt*-Dd2 ($P < 0,0001$).

4) Discussion/conclusion

Cette étude s'inscrit dans un contexte de surveillance de l'émergence des résistances aux antipaludiques au Cambodge. Depuis la réintroduction de l'AS-MQ comme traitement de première ligne en 2016, aucune donnée concernant son efficacité n'a encore été publiée. Les études cliniques entreprises de 2016 à 2019 au Cambodge ont montré une efficacité satisfaisante de l'AS-MQ, compte tenu de la forte proportion de parasites multi-résistants préalablement sélectionnés par l'utilisation de la DHA-PPQ (65,68,69,138,142). L'efficacité observée restant supérieure à 95%, l'AS-MQ remplit les critères pour le maintien de son utilisation au Cambodge.

Des souches résistantes à l'AS-MQ ont néanmoins émergé en 2018-2019. Au total, trois échecs cliniques ont été observés. Les parasites recrudescents présentaient tous des polymorphismes minoritaires du gène *K13* (*K13*-R539T et Y493H), ainsi qu'une amplification du gène *Mdr1* au jour de l'échec clinique, associée à une diminution de la tolérance à la MQ. Un nouveau groupe de souches résistantes à l'AS-MQ semble donc remplacer les souches résistantes à la DHA-PPQ qui s'étaient multipliées de 2010 à 2016 (91–93). L'utilisation de la DHA-PPQ avait en effet conduit à la sélection de souches KEL1/PLA1, présentant la mutation *K13*-C580Y associée à l'amplification des gènes *Pm2/Pm3*, et à certains polymorphismes dans le gène *Crt* (92,162,173). L'utilisation de l'AS-MQ a conduit à une forte diminution de la prévalence des parasites KEL1/PLA1 sensibles à la MQ. La prévalence des souches KEL1/PLA1 est aujourd'hui faible dans l'ensemble du Cambodge. Leur disparition est en adéquation avec la hausse de la tolérance des parasites à la MQ *in vitro* et le retour progressif de la sensibilité à la PPQ. Les souches KEL1/PLA1 ont donc été plus facilement éliminées qu'attendu par quatre ans d'utilisation de l'AS-MQ. Ces parasites se sont néanmoins propagés au Vietnam et en Thaïlande, où le traitement de première intention est la DHA-PPQ (62,91,158,163). Il est donc important de mettre en place des stratégies afin d'éliminer les parasites KEL1/PLA1 dans ces pays voisins.

Les mutants *K13*-R539T et Y493H étaient associés aux échecs cliniques à l'AS-MQ dans cette étude. La mutation Y493H semble émerger dans les provinces de Kampong Speu et Pursat, à l'Ouest du Cambodge. De 2007 à 2010, ces deux polymorphismes étaient observés dans des proportions similaires. La prévalence de la mutation Y493H dépassait alors 10% à Pailin et Pursat (120). L'amplification du gène *Mdr1* avait été associée à un groupe de parasites présents seulement à Pursat de 2007 à 2011, sans être associé à un polymorphisme spécifique dans le gène *K13*(238). Le Cambodge voit donc ré-émerger aux mêmes sites les profils génétiques de résistance présents durant la période 2008-2012, durant laquelle l'AS-MQ était le traitement de première ligne (120,144)

Une association entre le polymorphisme *K13*-R539T et la résistance à la MQ avait déjà été observée dans une précédente étude (172). Ce génotype aurait par conséquent pu conférer un avantage sélectif aux parasites soumis à la pression de l'AS-MQ. Le mutant *K13*-R539T n'a pourtant pas été conservé, sa prévalence déjà très faible étant devenue nulle en 2019.

La sélection de la mutation Y493H, jamais associée à la résistance à l'AS-MQ, était inattendue puisqu'elle confère aux parasites des niveaux de résistance à la DHA faibles, compris entre 0.5 et 5% en RSA. Cette mutation semble cependant être associée à l'amplification du gène *Mdr1* à l'Ouest du Cambodge, ce qui explique en partie la sélection de ce génotype par l'AS-MQ.

La mutation *K13*-C580Y reste néanmoins majoritaire dans tout le Cambodge, et l'amplification du gène *Mdr1* est exclusivement liée à la mutation C580Y à l'Est. Aucun parasite *K13*-C580Y recrudescence n'a pourtant été observé ces trois dernières années après traitement à l'AS-MQ. La sélection de l'allèle C580Y pourrait être expliquée par un avantage de transmission des gamétocytes présentant cet allèle, ou par un portage gamétocytaire plus important chez les patients infectés avec un clone *K13*-C580Y. Une durée de dormance prolongée des mutants *K13*-C580Y en comparaison avec les mutants *K13*-R539T et Y493H a pu être observée (données préliminaires non présentées). Ce temps de dormance prolongé pourrait augmenter le nombre de gamétocytes produits par les mutants *K13*-C580Y après traitement avec une CTA.

L'étude de la susceptibilité des isolats *in vitro* a aussi confirmé l'opposition précédemment observée entre les résistances à la PPQ et MQ (171,172). Les souches KEL1/PLA1 présentaient une sensibilité accrue à la MQ, ayant conduit au retour de la sensibilité à la MQ de 2010 à 2016. L'AS-MQ s'est alors imposé comme le traitement le plus stratégique au Cambodge pour remplacer la DHA-PPQ.

Parmi les échantillons testés pour les marqueurs de résistance, une infime proportion était « triple mutants », c'est-à-dire que ces isolats présentaient à la fois l'allèle *K13-C580Y* et une amplification des gènes *Pm2* et *Mdr1*. La prévalence et le phénotype de ces isolats ont été décrits dans la partie suivante.

Les résultats obtenus soulèvent des questions sur le mécanisme de résistance à la MQ. Plusieurs échantillons possédant une seule copie du gène *Mdr1* étaient résistants à la MQ *in vitro*, allant dans le sens d'une implication d'autres gènes dans la résistance à la MQ. Il en va de même pour la résistance à l'ART qui comme déjà observé précédemment ne semble pas être exclusivement associée à *K13* (140). Certains isolats *K13*-sauvages présentaient en effet un RSA^{0-3h} supérieur à 1%. Le mécanisme de résistance à l'ART a été exploré plus en détail dans la partie 2-III.

Plusieurs données restent en attente afin de compléter cette étude. Le nombre de parasites résiduels au 28^{ème} jour de traitement est en cours de détermination par PCR, pour les parasites collectés en 2016 durant l'utilisation de la DHA-PPQ ainsi que pour ceux isolés de 2017 à 2019 durant l'utilisation de l'AS-MQ. La comparaison du nombre de parasites résiduels chez les patients différemment traités pourrait constituer un bon indicateur de l'efficacité de l'AS-MQ sur certains clones parasitaires, notamment KEL1/PLA1.

Les données présentées pour le gène *Crt* entre 2016 et 2017 ne sont pas suffisantes pour permettre d'observer l'impact de l'utilisation de l'AS-MQ sur l'évolution des polymorphismes associés à la résistance à la PPQ. Les polymorphismes T93S, H97Y, F145I, I218F, M343L et G353V du gène *Crt* sont en cours de séquençage pour un plus grand nombre d'échantillons prélevés de 2016 à 2019. Par hypothèse, la prévalence de ces polymorphismes devrait diminuer entre 2017 et 2019 de la même

façon que celle des souches KEL1/PLA1. L'augmentation de la sensibilité à la MQ de parasites présentant l'allèle T93S va dans le sens de cette hypothèse. De plus, les parasites *K13*-sauvages étaient plus tolérants à la MQ que les parasites *K13*-mutés, sans amplification des gènes *Pm2* et *Mdr1*. Ce résultat peut être expliqué par la présence de mutations dans le gène *Crt* des parasites *K13*-mutants, qui pourraient les sensibiliser à la MQ (en cours d'étude).

Enfin, les origines phylogénétiques des parasites recrudescents collectés entre 2017 et 2019 sont en cours d'analyse. Ces résultats permettront de préciser si les parasites résistants à l'AS-MQ proviennent des clones ayant émergé entre 2008 et 2012 au Cambodge.

En conclusion, malgré l'efficacité de l'AS-MQ au Cambodge, la surveillance (clinique, moléculaire et phénotypique) doit être maintenue, et d'autres options envisagées en cas de multiplication des souches résistantes et des échecs cliniques. La prévalence de *P. falciparum* étant maintenant très faible au Cambodge, il est important d'adapter rapidement les stratégies thérapeutiques afin d'éviter la sélection de parasites résistants à l'AS-MQ. Cette prochaine intervention pourrait permettre l'élimination de *P. falciparum* au Cambodge.

B. Prévalence et phénotype des isolats triple-mutants cambodgiens

1. Introduction

En 2017, l'émergence de souches de *P. falciparum* présentant les marqueurs de résistance à l'ART, à la PPQ et à la MQ a été signalée dans la province de Preah Vihear, au Nord du Cambodge. Ces souches «triple-mutantes» ont été observées dans une proportion alarmante de près de 30% juste après l'introduction de l'AS-MQ dans cette province en 2016 (173). La multiplication de parasites présentant un tel génotype serait problématique considérant le peu d'options thérapeutiques capables de remplacer l'AS-MQ, et constituerait un réel obstacle à l'élimination proche du paludisme au Cambodge. Il était important d'étudier le phénotype de résistance des parasites triple-mutants, étant

donné le développement de la triple combinaison DHA-PPQ-MQ actuellement en cours d'étude clinique envisagée comme traitement au Cambodge (239,240). Le travail de surveillance moléculaire mis en place à l'Institut Pasteur du Cambodge a permis de déterminer les polymorphismes du gène *K13*, ainsi que le nombre de copie des gènes *Mdr1* et *Pm2*, pour un grand nombre de souches parasitaires collectées depuis 2012. L'évolution des marqueurs de résistance à l'ART, MQ et PPQ, ainsi que la proportion d'isolats triple-mutants de 2012 à 2019 a ainsi pu être observée. Le phénotype de résistance de ces parasites a été déterminé par tests phénotypiques *in vitro*. L'ensemble de ces données a permis d'apporter un éclairage important sur l'évolution de ces souches au Cambodge et sur leur degré de résistance.

2. Discussion-Conclusion

La prévalence et le phénotype des isolats triple-mutants observés au Cambodge ont été déterminés. Ces souches semblent avoir émergé seulement à l'Ouest du Cambodge. La très faible proportion d'isolats triple-mutants observée entre 2016 et 2018 (0.15%) indique qu'un tel profil de résistance reste très rare et semble engendrer un coût biologique important pour la survie des parasites. Nos données ne concordent pas avec les résultats de Rossi *et al.* en 2016, qui avaient observé 30% de souches triple-mutantes après introduction de l'AS-MQ à Preah Vihear (173). Outre la différence de sites de collection entre les études, cette différence de proportion peut s'expliquer par un changement de la méthode PCR utilisée pour déterminer le nombre de copies des gènes *Mdr1* et *Pm2*. Un manque de reproductibilité du nombre de copies du gène *Mdr1* avait en effet été observé avec la PCR décrite (température d'hybridation à 58°C) (150). Le protocole de qPCR a donc été ajusté à l'Institut Pasteur du Cambodge en 2017, en augmentant la température d'hybridation à 63°C afin d'améliorer la spécificité. Le nombre de copies du gène *Mdr1* des échantillons collectés par Rossi *et al.* a été mesuré avec ce nouveau protocole de qPCR 63°C. Seulement 4 échantillons parmi les 28 initialement documentés comme étant triple-mutants, ont été trouvés amplifiés pour *Mdr1* et *Pm2* avec cette méthode.

Cette étude décrit pour la première fois le phénotype de résistance des souches triple-mutantes. L'expression de *Mdr1* et *Pm2* semble augmentée chez les parasites triple-mutants (données à compléter avec un plus grand nombre d'échantillons contrôles). La triple-résistance de ces souches à l'ART, à la PPQ et à la MQ a aussi été confirmée *in vitro*. Pour la grande majorité des échantillons testés (*K13-C580Y + Pm2/3* amplifié ou *K13-C580Y + Mdr1* amplifié), une corrélation inverse entre la susceptibilité à la PPQ et à la MQ a pu être observée, comme l'avaient déjà montré plusieurs études (171,172). Le mécanisme inverse de résistance à la PPQ et MQ est pour l'instant inconnu.

De façon étonnante, les parasites *K13-C580Y/Mdr1*-amplifiés et triple mutants présentaient un niveau de susceptibilité similaire après une co-administration de MQ + PPQ ($CI_{50}=72,8$ nM et 66,8nM respectivement, figure 26 non incluse dans l'article). Ce résultat ouvre de nouvelles questions sur le mécanisme inverse de résistance à ces deux molécules. La co-administration de MQ et PPQ semble en effet désensibiliser les parasites *K13-C580Y/Mdr1*-amplifiés à la PPQ. La figure 26 suggère l'implication de *Mdr1* sur la perte d'action de la PPQ en présence de MQ. L'interaction moléculaire entre MQ et PPQ pourrait favoriser l'efflux de PPQ par la protéine PGH1. Il serait intéressant d'étudier ce mécanisme plus en détail, d'abord en testant un plus grand nombre de parasites *Mdr1*-amplifiés avec cette double-combinaison, pour confirmer ce résultat. Par la suite, les concentrations intra-parasitaires de PPQ pourraient être comparées, avec ou sans co-traitement avec la MQ, et pour différents profils d'amplification du gène *Mdr1*. L'implication de *Mdr1* dans l'efflux de PPQ pourrait aussi être étudiée en mesurant le transport intra-parasitaire de PPQ après inhibition de PGH1 (pompe à efflux encodée par le gène *Mdr1*). Des inhibiteurs de glycoprotéines-P (P-gp) de troisième génération tels que ONT-093 et XR-9576 ont été montrés efficaces pour inhiber la protéines PGH1 (241), et pourraient être utilisés *in vitro* sur des cultures de parasites.

La résistance inverse des parasites à la PPQ et à la MQ au niveau clinique pourrait aussi être expliquée par une interaction entre les deux molécules au sein de l'hôte humain. La PPQ et la MQ sont en effet

métabolisées par le même cytochrome P450 3A dans les hépatocytes (242,243). L'interaction entre la PPQ et la MQ pourrait donc modifier le métabolisme des deux molécules chez les patients traités.

L'ensemble de ces résultats confirme la possible émergence de résistance des parasites *K13-C580Y/Mdr1*-amplifiés (dont la prévalence a rapidement augmenté au Cambodge ces dernières années) à la triple-CTA DHA-PPQ-MQ.

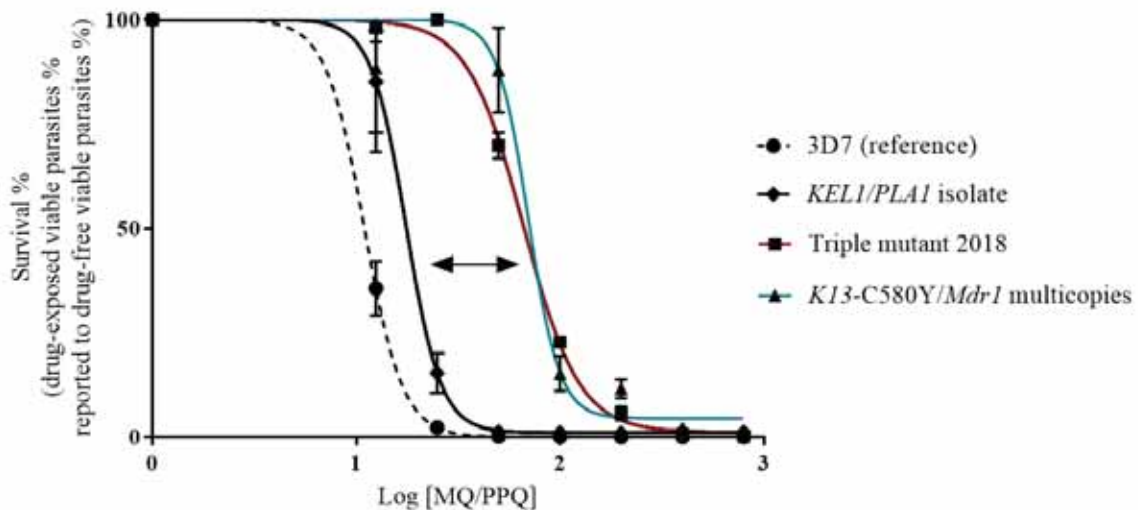


Figure 26 : Complément de la figure 4 de l'article – ajout de la courbe d'inhibition de la double combinaison de MQ+PPQ d'un isolat *K13-C580Y/Mdr1*-amplifié (courbe bleue).

En conclusion, cette étude a permis de montrer qu'un très faible pourcentage de souches triple-mutantes circule au Cambodge. La triple-résistance phénotypique de ces isolats à l'ART, PPQ et MQ appelle cependant à reconsidérer l'utilisation de la triple combinaison DHA-PPQ-MQ, qui pourrait favoriser la sélection de ce rare profil, ainsi que celle des parasites *K13*-mutés/*Mdr1*-amplifiés.

3. Article

Prevalence, genotype and phenotype of triple-mutant *P. falciparum* isolates in Cambodia

Mélissa Mairet-Khedim, Nimol Khim, Srun Sreynet, Anthony Bouillon, Selma Topcu, Saorin Kim, Sohpeakvatey Ke, Kaoy Chhayleang, Rotha Eam, Kean Chanra, Kol Chanvong, Sophy Chy, Pascal Ringwald, Rithea Leang, Jean Christophe Barale, Benoit Witkowski

En cours de finalisation.

Prevalence and phenotype of triple-mutant *P. falciparum* isolates in Cambodia

Mélissa Mairet-Khedim^{1,2†}, Nimol Khim^{1†}, Srun Sreynet¹, Anthony Bouillon^{2,5}, Selma Topcu^{2,5}, Saorin Kim¹, Sohpeakvatey Ke¹, Kauy Chhayleang¹, Rotha Eam¹, Kean Chanra¹, Kol Chanvong¹, Sophy Chy¹, Pascal Ringwald⁴, Rithea Leang³, Jean Christophe Barale^{2,5}, Benoit Witkowski^{1,2*}

1: Malaria Molecular Epidemiology Unit, Pasteur Institute in Cambodia, Phnom Penh Cambodia

2: Malaria Translational Research Unit, Pasteur Institute, Paris, France

3: National Center for Malariology, Entomology and Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia

4: World Health Organization, Geneva, Switzerland

5: Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur, Paris, France

Pasteur Institute in Cambodia

†= MMK and NK contributed equally

*: corresponding author bwitkowski@pasteur-kh.org

Running title: Prevalence and phenotype of “triple-mutant” *P. falciparum* isolates in Cambodia.

ABSTRACT

Background: In 2016, 30% of *Plasmodium falciparum* isolates collected in Preah Vihear, Northern Cambodia, presented the molecular markers associated with artemisinin, piperaquine and mefloquine resistance. However, the distribution of such parasites countrywide and the associated phenotype remains unknown.

Objectives: Evaluate the prevalence of triple-mutant *P. falciparum* parasites in Cambodia between 2016 and 2018, and describe their resistance phenotype to artemisinin, piperaquine and mefloquine.

Methods: From 2016 to 2018, *P. falciparum* isolates were collected in different provinces of Cambodia. *Kelch13* polymorphism, together with *Plasmepsin2* and *Mdr1* gene copy number were determined, as respective molecular markers of artemisinin, piperaquine and mefloquine resistance. In order to better describe triple-mutant parasites, *Plasmepsin2* and *Mdr1* expression levels were quantified, and *in vitro* susceptibilities to dihydroartemisinin, piperaquine and mefloquine were determined.

Results: Only 0.15% of the 683 *P. falciparum* isolates collected between 2012 and 2019 presented a triple-mutant pattern. The double amplification of *Plasmepsin2* and *Mdr1* was associated with an increased transcription of the two genes. The triple-mutant parasites presented a resistant phenotype to a single exposure of dihydroartemisinin, piperaquine and mefloquine, but also survived exposure to piperaquine + mefloquine combination.

Conclusion: Despite being a really rare event, triple-mutant parasites emerged in Cambodia, and presented an artemisinin, piperaquine and mefloquine resistant phenotype. It is important to consider such strains as a possible obstacle for the efficiency of artemisinin/piperaquine/mefloquine triple combinations.

BACKGROUND

Artemisinin based Combination Therapies (ACTs) associate an artemisinin derivative molecule and a long-lasting partner drug. This formulation has initially been developed to minimize the risk of resistant parasite selection. In spite of this concept, further clinical and parasitological evidences have demonstrated that resistance to ACT is possible.

ACT-resistance is a multi-resistance feature associating artemisinin resistance to partner compound resistance. There is to date no therapeutic option to replace artemisinin for non-severe malaria case management. Artemisinin resistance is linked to key mutations in the *Kelch13* propeller domain and is clinically translated in a delayed clearance. Such resistance phenotype is partial and artemisinin conserves a valuable plasmocidal activity. The addition of resistance to partner drug is more problematic. Parasite could reach a high grade of resistance leading to an important rate of failure. While not immediately life threatening for non-severe cases, failure of ACT to treat patients are largely jeopardizing control measures. Therefore and out of artemisinin resistance issue, partner drug efficacy is critical.

Cambodia is the epicenter of ACT resistance emergences. Over the last decade, parasites resistant to all ACT implemented have been monitored in this country (1–3). Secondly, resistant parasites emerging in Cambodia have spread in neighboring countries (4).

Chronologically, the implementation of the first ACT, artesunate/mefloquine, in 2006 has led to a rapid emergence of parasites resistant to this combination (2,3). In 2012, dihydroartemisinin/piperaquine was then chosen as a replacement drug, but was removed from the National Treatment Guidelines four years later, due to resistance issue (5,6). In 2016, artesunate/mefloquine was re-introduced despite a previous resistance history.

Genetically, parasites resistances to mefloquine and piperaquine are respectively associated with *Mdr1* and *Plasmepsin2* gene amplification (6,7). Piperaquine and mefloquine resistances

were considered to be mutually exclusive (8). Based on this mutual exclusion concept, novel initiatives proposing double partner drug associations are now under investigation. Among those, mefloquine/piperaquine (9) is a potential option. Considering that double resistance to PPQ and MQ is unlikely to emerge, such pharmacological design could possibly and elegantly offer to the parasites a drastically limited evolutionary window.

However, in 2017, G. Rossi and collaborators warned on the recent emergence of triple-mutant isolates collected in 2016 in the Preah Vihear province in Cambodia, which presented all the molecular markers associated with artemisinin, mefloquine and piperaquine resistance, with a very high prevalence of 30% (10). This finding was alarming as it questioned the exclusive advantage of piperaquine and mefloquine resistance, as well as triple combination, based on this principle. This study was however focused on a unique site in Cambodia and did not include a phenotypical measurement of piperaquine and mefloquine susceptibility of the collected isolates. Therefore, the prevalence of triple-mutant and the associated phenotype remains an open question.

In this study, we have therefore investigated the prevalence of triple-mutant isolates the last ten years in Cambodia and determined whether these genetic traits modulate parasite susceptibility to MQ and PPQ.

METHODS

***P. falciparum* clinical isolates**

Parasite isolates were collected from Cambodian patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria enrolled in WHO therapeutic efficacy studies (2012-2019). Venous blood was sampled on acid-citrate-dextrose tubes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). 200 μ L of fresh blood were frozen at -20°C for DNA extraction, and the remaining infected blood was adapted to *in vitro* culture at 2% hematocrit (O⁺ human blood, Centre de Transfusion Sanguine, Phnom Penh, Cambodia) in RPMI 1640 supplemented with 0.5% albumax II, 2.5% human plasma (mixed serogroups) under an atmosphere of 5% CO₂ and 5% O₂. The 3D7 reference strain was furnished by the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4) and cultivated under the same conditions.

Molecular resistance markers determination

Pfk13-propeller domain (PF3D7_1343700 from codon 445 to 680) polymorphism was determined by Sanger's method sequencing according to Arie *et al* (11). *Mdr1* and *Plasmepsin2* copy number variations were determined by qPCR according to Witkowski *et. al.* with modification of the hybridization temperature to 63°C (6).

***Plasmepsin2* and *Mdr1* gene expression**

RNA was extracted from 5-10% rings 12-15 hours post-invasion with 1 mL of Trizol added to 50-100 μ L of red blood followed by 200 μ L of chloroform. After 15 minutes of centrifugation at 12000g, the aqueous phase was extracted and mixed with ethanol 100%. RNA was then purified at 4°C using the RNeasy kit (Quiagen), following the manufacturer instructions. Remaining genomic DNA was digested with DNase I (Promega). After reverse transcription of RNA to cDNA (Promega Goscript kit), quantitative PCR was finally performed to quantify

Mdr1 and *Plasmepsin2* gene expression (6), using the *Seryl-tRNA synthetase* gene (PF07_073) as housekeeping gene.

Mefloquine *in vitro* susceptibility assay

Mefloquine was provided by WWARN and prepared in 0.5% lactic acid. Parasites *in vitro* susceptibility to mefloquine was determined by using H³-hypoxanthine uptake inhibition assay as previously described, with modifications (12). Dimethyl-sulfoxide (Sigma Aldrich, Singapore) was used as vehicle. Parasites were synchronized at ring stage with a D-sorbitol treatment (0-12h post-invasion) and exposed to a concentration range of mefloquine (2 to 1500 nM) for 48h in presence of 0.5 μ CI of H³-Hypoxanthine (Perkin-Elmer, Waltham, USA). Tritium incorporation was measured with a β -counter (Trilux microbeta; Perkin-Elmer Waltham, USA). Inhibitory concentrations values (IC₅₀) were determined using ICEstimator software (<http://www.antimalarial-icestimator.net>).

Piperaquine *in vitro* susceptibility assay (PSA)

Piperaquine was provided by WWARN and prepared in 0.5% lactic acid. Piperaquine survival assay was performed according to Witkowski *et al* (6). Briefly, rings 0-3h post-invasion were obtained by 75% Percoll centrifugation and adjusted between 0.5 and 1% parasitemia. Parasites were exposed to 200 nM of piperaquine, and 0.5% lactic acid as drug-free control. The drug was washed out after 48h of exposure. Parasitemia was measured by microscopy counting of 10000 red blood cells, after 72h of culture. For each parasite strain tested, a survival rate was determined as a ratio between the parasitemia in the drug-exposed condition and the parasitemia in the drug-free control condition.

Ring-stage survival assay (RSA)

Dihydroartemisinin was provided by WWARN and prepared in dimethyl-sulfoxide. The assay followed the same steps than PSA for parasites preparation. Between 0.5 and 1% of rings 0-3

hours post-invasion were exposed to 700 nM of dihydroartemisinin for 6 hours. After washout of the drug, the parasites were kept in culture 66 more hours. A survival rate was determined by microscopy as a ratio between the parasitemia in the drug-exposed condition and the parasitemia in the drug-free control (13).

Piperaquine and mefloquine double pressure *in vitro* assay

Rings 0-3h post-invasion were obtained by 75% Percoll centrifugation and adjusted between 0.5 and 1% parasitemia. Parasites were exposed to seven increasing doses of piperaquine + mefloquine (from 12.5 to 800 nM) for 48 hours. After drug washout, the parasites were maintained 24 more hours in culture. After a total of 72h, a blood smear was performed for each condition and the parasite survival percentage was determined as a ratio between the proportion of viable parasites in the drug-exposed condition and the proportion of viable parasites in the drug-free control. Three biological replicates were performed.

Ethical

All isolates have been collected during therapeutic efficacy studies (TES) conducted in accordance with Cambodian National Ethical Committee.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed using graphpad 7.0 software. Spearman correlation test was used to compare mefloquine and piperaquine *in vitro* susceptibilities. Mann-Whitney's test were performed to compare the relative expression of *Mdr1* and *Plasmepsin2* genes between different groups of samples. A P-value <0.05 was considered as statistically significant. IC₅₀ of the piperaquine + mefloquine combination was determined for each strain and compared using the nonlinear regression tool on graphpad 7.0 software.

RESULTS

Evolution of molecular markers of resistance from 2016 to 2018

Between 2016 and 2018, *P. falciparum* field isolates were collected as part of Therapeutic Efficacy Studies performed in Cambodia. *Kelch13* gene polymorphism analysis and copy number variation analysis of *Mdr1* and *Plasmepsin2* genes were performed retrospectively (figure 1.a). Among the 683 samples, 1/683 (0.15%) harbored both *Mdr1* and *Plasmepsin2* gene amplification. As part of previous therapeutic efficacy studies not included in this work (already published), we collected three triple-mutant isolates in 2012 in Pursat. In this study, only one isolate was collected in 2018 in Kampong Speu. The two provinces are located in Western Cambodia (Figure 1.b).

Gene expression analysis of triple-mutant isolates

Seven strains were selected according to their genotype: two strains with *Mdr1* amplification, two strains with *Plasmepsin2* amplification, and three strains presenting double-amplification of both *Mdr1* and *Plasmepsin2* genes. The expression mean was normalized to the expression of 3d7 for the two genes. *Mdr1* relative expression mean of triple-mutant, *Mdr1*-multicopy and *Plasmepsin2*-multicopy parasites were respectively 5.6 (SD= 1.13), 4.8 (SD= 0.32), and 1.5 (SD= 0.40). *Plasmepsin2* relative expression mean of triple-mutant, *Mdr1*-multicopy and *Plasmepsin2*-multicopy parasites were respectively 4.0 (SD=1.8), 1.9 (SD=0.8), and 7.3 (SD=2.36). The relative expression of *Mdr1* was not statistically different between triple-mutant parasites and *Mdr1*-single copy parasites. The relative expression of *Plasmepsin2* was not statistically different between triple-mutant parasites and *Plasmepsin2*-single copy parasites.

Phenotypic characterization of triple-mutant isolates

Mefloquine IC_{50} was successfully determined for 87 *Kelch13*-mutant isolates sampled between 2012 and 2018 (figure 3.A). Piperaquine survival rate was measured by piperaquine survival assay for 92 *Kelch13*-mutant isolates collected at the same period (figure 3.B). Mefloquine median IC_{50} of triple-mutant, *Mdr1*-multicopy and *Plasmepsin2*-multicopy parasites were respectively: 80.7 [IQR: 70.9 – 85.5], 92.8 [IQR: 77.0 – 116.6] and 16.6 [IQR: 10.2 – 26.9]. Piperaquine median survival rate of triple-mutant, *Mdr1*-multicopy and *Plasmepsin2*-multicopy parasites were respectively 14.9 [IQR: 14.4 – 33.9], 0.45 [IQR: 0 – 2.0] and 48.6 [IQR: 26.4 – 70.2]. The Spearman correlation between piperaquine and mefloquine *in vitro* susceptibilities was $R = -0.53$. The P value for the Spearman test was <0.0001 . The dihydroartemisinin mean survival rate (tested by RSA) was 6.63 nM for the triple-mutant isolates.

Triple-mutant isolates are resistant to simultaneous PPQ and MQ drug pressure *in vitro*

The triple-mutant isolate collected in 2018 was adapted in culture and exposed to increasing doses of mefloquine and piperaquine (figure 4). The piperaquine + mefloquine IC_{50} of the triple-mutant isolate was 66.76 nM. KEL1/PLA1 piperaquine + mefloquine IC_{50} was 17,66 nM. The 3D7 drug-sensitive control strain had an IC_{50} of 10.98 nM. The difference between the curves was statistically significant.

Discussion

The selection of parasites resistant or tolerant to antimalarial drugs in Cambodia is an extremely dynamic process, at least for the ACT implemented so far. In line with this general observation, Rossi and colleagues have alarmed about selection of parasites potentially multi-resistant to piperazine and mefloquine (10). To ascertain this concern, the related study have shown a fast and massive selection of parasites harboring double amplification of *Plasmepsin2* and *Mdr1*. The main theory was an adaptation of the pre-existing parasites resistant to dihydroartemisinin/piperazine to artesunate/mefloquine pressure through *Mdr1* amplification on top of C580Y-amplified *Plasmepsin2* background. Worryingly, this selection has occurred extremely rapidly after artesunate/mefloquine implementation. In 2017, artesunate/mefloquine was fully implemented at national level in Cambodia. According to Rossi *et. al.* we should suppose a massive selection of triple-mutant. On the contrary, we saw an extremely limited prevalence of this haplotype in a larger sample size. Therefore we conclude that the selection process countrywide was different. So far we have no explanation for this discrepancy. C580Y-*Plasmepsin2* amplified strains were predominantly represented in Cambodia before artesunate/mefloquine deployment. We are additionally concluding that triple-mutant parasites do not present a major selective advantage upon artesunate/mefloquine pressure. Moreover, we noticed an elevated biological cost of these pattern depicted by an unstable phenotype upon *in vitro* culture (data not shown). Despite being rare and potentially unfit, the triple-resistance pattern has functional implication. The phenotype of these uncommon parasites have been characterized here. The parasites with co-amplification of *Plasmepsin2* and *Mdr1* clearly present a phenotype of increased tolerance to MQ and PPQ. No significant difference was observed regarding MQ sensitivity for parasites with double amplification vs. single *Mdr1* amplification. PPQ tolerance was however lower compared to single *Plasmepsin2* amplified parasites. Despite this, all parasites harboring double amplification shown a PSA value above

the threshold associated with clinical failure following dihydroartemisinin/piperaquine regimen. Transcriptomic analysis were in line with this observation as higher transcription of *Mdr1* and *Plasmepsin2* was observed in comparison to isolates with single amplification. This study do have limitation regarding the impact of such pattern. Considering the rarity of these isolates, the clinical significance of this pattern was impossible to establish.

Conclusion

These data showed that emergence of triple-mutant has not happened in Cambodia. The explanation could be disadvantage of this genotype verse single *Mdr1* amplification in a context of artesunate/mefloquine pressure. According to these hypothesis, it is likely that double amplification will not represent an immediate issue upon artesunate/mefloquine deployment. However, parasites harboring double amplification got a noticeable selective advantage over joint exposure to mefloquine and piperaquine. In the hypothetical context of triple-ACT implementation, this genetic pattern could be selected, jeopardizing drug efficacy.

Transparency declaration

None to declare.

Funding

This study was supported by 5% Initiative.

Acknowledgements

We would to thanks the patients that have accepted to participate TES studies and the Cambodian Health Centers personals for their contribution.

Author's contribution

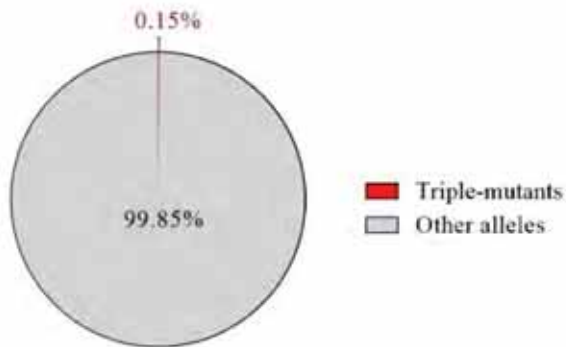
MMK and SS did *in vitro* experiments and gene expression analysis, analysed the results and wrote the manuscript. NK did molecular assessment of resistance markers, and did and supervised sample collection. BW designed the study, analysed the results and wrote the manuscript.

References

1. Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C. Dihydroartemisinin–Piperaquine Failure in Cambodia. *N Engl J Med*. 31 juill 2014;371(5):484-5.
2. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against *Falciparum* Malaria on the Cambodia–Thailand Border. *Emerg Infect Dis*. mai 2008;14(5):716-9.
3. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J*. 12 janv 2009;8:10.
4. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis*. mai 2017;17(5):491-7.
5. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 août 2015;59(8):4719-26.
6. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *Lancet Infect Dis*. févr 2017;17(2):174-83.
7. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *The Lancet*. 31 juill 2004;364(9432):438-47.

8. Veiga MI, Ferreira PE, Malmberg M, Jörnham L, Björkman A, Nosten F, et al. *pfmdr1* Amplification Is Related to Increased Plasmodium falciparum In Vitro Sensitivity to the Bisquinoline Piperaquine. Antimicrob Agents Chemother. juill 2012;56(7):3615-9.
9. Hanboonkunupakarn B, Pluijm RW van der, Hoglund R, Pukrittayakamee S, Winterberg M, Mukaka M, et al. Sequential open label study of the safety, tolerability and pharmacokinetic interactions between dihydroartemisinin-piperaquine and mefloquine in healthy Thai adults. Antimicrob Agents Chemother. 10 juin 2019;AAC.00060-19.
10. Rossi G, Smet MD, Khim N, Kindermans J-M, Menard D. Emergence of Plasmodium falciparum triple mutant in Cambodia. Lancet Infect Dis. 1 déc 2017;17(12):1233.
11. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. Nature. 18 déc 2013;505(7481):50-5.
12. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother. 1 déc 1979;16(6):710-8.
13. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. Lancet Infect Dis. déc 2013;13(12):1043-9.

A.



B.



Figure 1: a. Prevalence of triple-mutant isolates from 2016 to 2018 in Cambodia. *Kelch13* polymorphisms, and copy number of *Plasmepsin2* and *Mdr1* genes were determined for 683 isolates collected in Cambodia from TES studies between 2016 and 2019. Other alleles: *Kelch13*-WT and *Kelch13*-mutant, with or without *Plasmepsin2* or *Mdr1* amplification. **b.** Repartition map of triple-mutant isolates in Cambodia (red star). The provinces included in TES studies are indicated in grey. Preah Vihear province: site of Rossi *et al.* study.

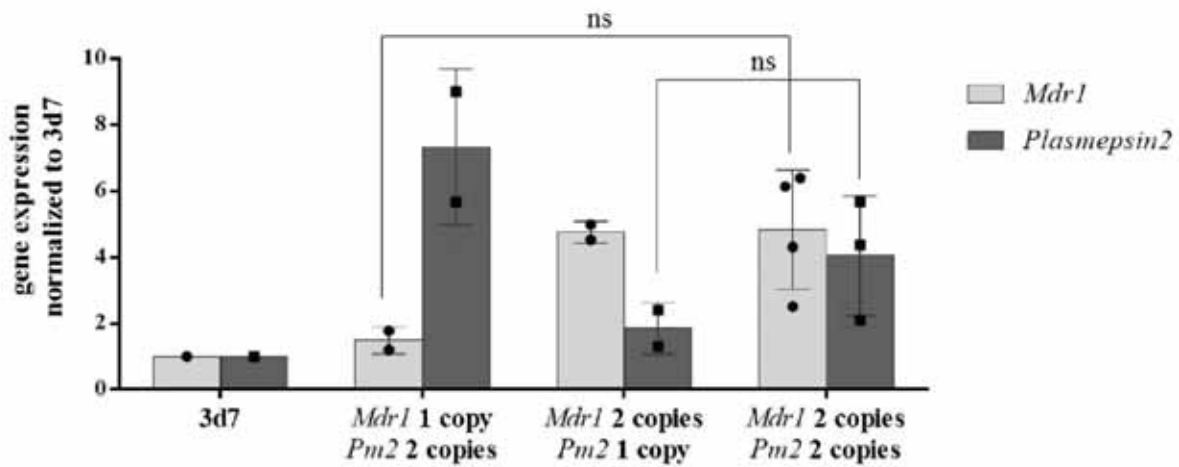


Figure 2: Expression of *Mdr1* and *Plasmepsin2* genes in “triple mutant” isolates. *Mdr1* and *Plasmepsin2* normalized expression levels were quantified for the four triple mutant isolates collected between 2012 and 2019. Four strains were used as expression control, two were amplified for *Mdr1* gene only, and two others for *Plasmepsin2* gene only. 3d7 was used as a reference gene to calculate the relative expression of the two genes. The differences of gene expression between the groups were compared using Mann Whitney test. The difference between the normalized expression of triple mutants isolates and other control groups was not significant ($P > 0.05$).

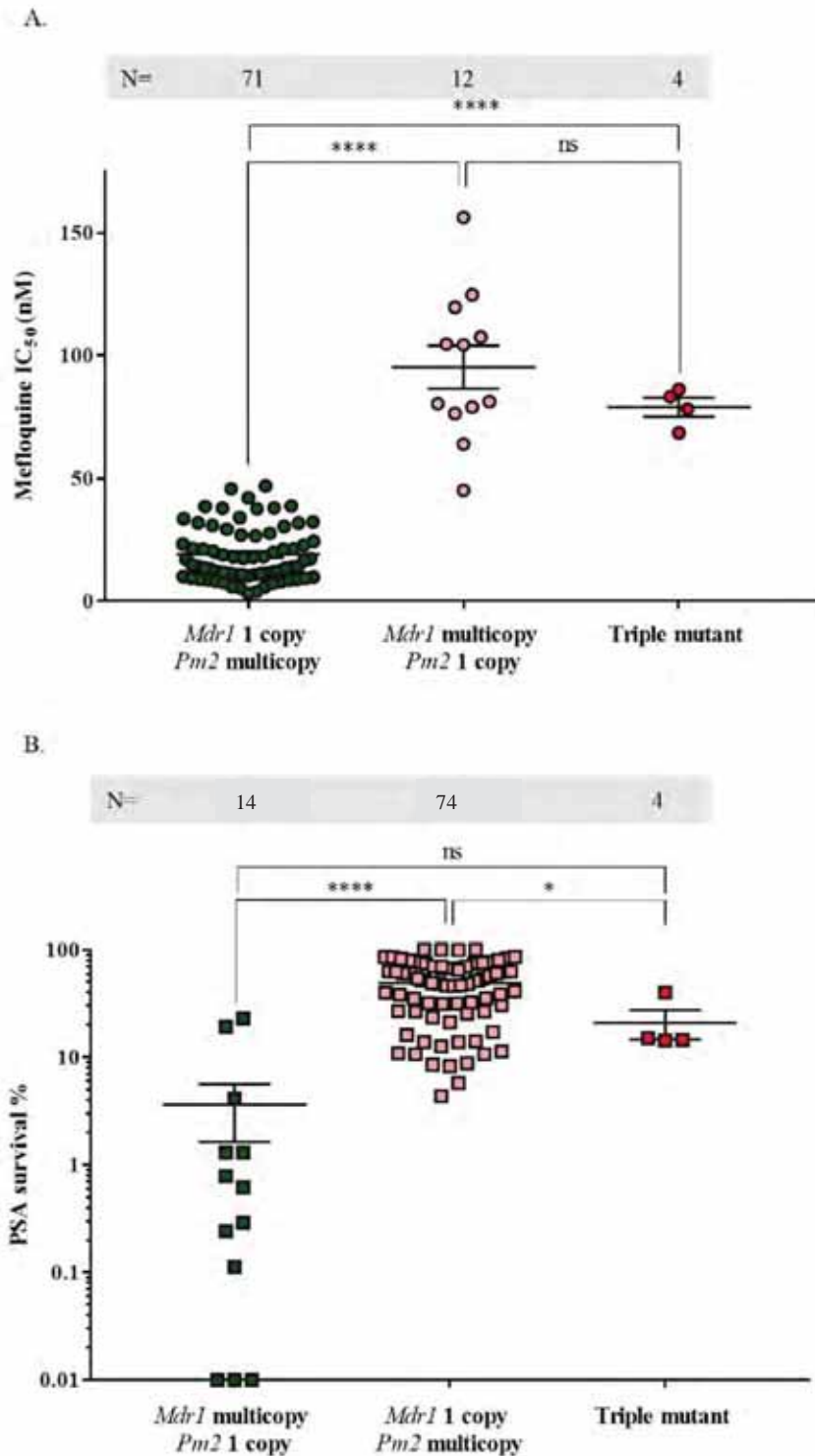


Figure 3: Phenotypic characterization of “triple mutant” isolates. *P. falciparum* isolates collected from 2012 to 2018 were adapted in culture. Their resistance phenotype to mefloquine (A) and piperazine (B) was assessed, according to their genotype (multicopy *Plasmepsin2*, multicopy *Mdr1*, or Multicopy *Plasmepsin2* + *Mdr1*), and expressed using mean and SEM. The groups were compared using Mann Whitney test. * : <0.05; **** : < 0.0001; ns: non-significant.

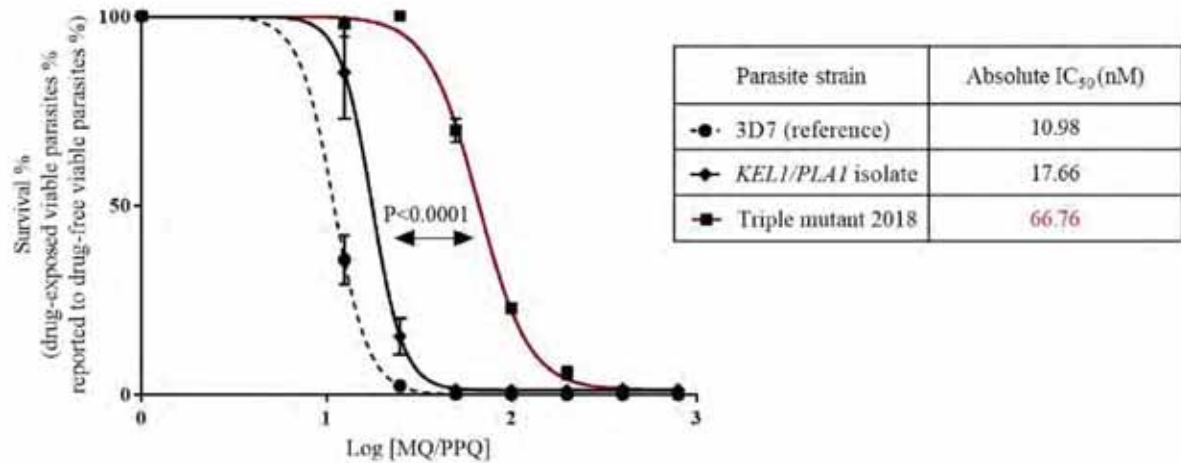


Figure 4: Triple-mutant parasites are less susceptible than *KEL1/ PLA1* parasites to a double pressure with piperavaquine and mefloquine. Absolute IC_{50} were measured for the 3d7 reference strain, for one *KEL1/PLA1* isolate and for one triple mutant sample isolated in 2018. Eight doses of piperavaquine + mefloquine (from 0 to 800 nM) were added to rings 0-3h post invasion for 48 hours. A survival percentage reported to the parasitemia in the drug-free control was then calculated based on parasite counting. Three biological replicates were performed. The triple-mutant and *KEL1/PLA1* IC_{50} curves were considered statistically different after nonlinear regression analysis, comparison of fits ($P < 0.0001$).

C. Efficacité de la DHA-PPQ pour les infections non compliquées à *P. falciparum* au Cameroun

1. Introduction

La résistance aux CTA n'a pas encore été documentée au Cameroun. Malgré une très forte transmission de *P. falciparum*, les parasites semblent conserver leur sensibilité aux différentes CTA de première ligne (AL et ASAQ) utilisées depuis 2004 (244). L'utilisation de la DHA-PPQ a largement augmenté au Cameroun depuis 2012, en raison d'un changement des politiques de traitement ces dernières années. En effet, une méfiance collective vis-à-vis de l'ASAQ s'est peu à peu installée, ce traitement ayant été suspecté par la population de causer des prurits. L'ASAQ est donc de moins en moins utilisé en raison de la réticence des patients. En 2012, de nombreuses versions contrefaites d'AL ont été découvertes, entraînant une baisse de la commercialisation de cette combinaison au profit de la DHA-PPQ.

La DHA-PPQ a été largement utilisée en Asie du Sud-Est. L'avantage de la PPQ comme molécule partenaire est qu'elle n'a été que très peu utilisée en monothérapie (seulement en Chine). Des parasites résistants à la DHA-PPQ ont pourtant émergé au Cambodge ces dix dernières années. Cette résistance s'est propagée en Asie du Sud-Est (64,160). Les marqueurs moléculaires associés à la résistance à la DHA-PPQ en Asie du Sud-Est sont les polymorphismes du gène *K13* et *Crt* et l'amplification des gènes *Pm2/3* (120,150,158).

Peu de données concernant l'efficacité de la DHA-PPQ en Afrique ont été publiées, malgré une utilisation croissante de cette combinaison (55–58,245,246). Il était donc important de surveiller l'efficacité de la DHA-PPQ, aujourd'hui largement utilisée au Cameroun, sachant que plusieurs études ont déjà rapporté une hausse de la proportion des souches amplifiées pour le gène *Pm2/3* en Afrique de l'Ouest (165,166). Dans ce but, une étude d'efficacité thérapeutique de la DHA-PPQ a été mise en place de janvier à mai 2018 au Cameroun, au Centre de Santé de Nkol-Eton, au centre de la capitale Yaoundé. 152 patients ont été traités et suivis pendant 42 jours. La prévalence des principaux marqueurs moléculaires de résistance à l'ART et à la PPQ (*K13* et *Pm2*) a été déterminée, et la

susceptibilité des isolats à l'ART et à la PPQ a été évaluée *in vitro* par test de survie (PSA et RSA). La capitale Yaoundé était une zone de choix pour cette étude, où le taux d'inoculation entomologique peut atteindre 100 piqûres infectantes par personne par année (202,247). Le recrutement des patients s'est fait directement au centre de santé, facilitant leur suivi. Toute la partie clinique a été coordonnée par le Centre Pasteur du Cameroun. Les marqueurs moléculaires de résistance ont été étudiés au Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan. Les tests phénotypiques de susceptibilité *in vitro* et le génotypage ont été réalisés à l'Institut Pasteur du Cambodge.

2. Discussion/conclusion

Cette étude confirme l'efficacité de la DHA-PPQ pour le traitement des infections non compliquées à *P. falciparum* au Cameroun. En dépit de l'utilisation massive de cette combinaison depuis 2012, son efficacité était de 100% après correction PCR, et 92% avant correction PCR. Ces résultats concordent avec des études plus anciennes ayant montré une efficacité de la DHA-PPQ comprise entre 92 et 100% au Cameroun (248,249), mais aussi dans d'autres pays d'Afrique comme le Kenya, le Mali, l'Ouganda et l'Angola (55,56,58,245).

La proportion d'échecs cliniques observée avant correction PCR était similaire à celle d'autres études réalisées en Afrique (inférieure à 10%) (56–58,157). Tous ces échecs étaient dus à des réinfections, et aucun n'était associé à la présence de formes asexuées à jour 3. Les parasites circulant au Cameroun semblent donc conserver leur sensibilité à l'ART. Les données moléculaires obtenues allaient aussi dans ce sens. 96% des échantillons testés présentaient une séquence *K13* sauvage. Seuls 2% des échantillons présentaient la mutation non-synonyme A578S dans la partie hélice du gène *K13*. Cette mutation n'était pas associée à une hausse de la tolérance des parasites à la DHA *in vitro*.

Ce travail a pour la première fois documenté la présence de la mutation A578S au Cameroun au cours d'une étude clinique. Une analyse moléculaire du gène *K13* réalisée en 2015 au Cameroun avait identifié des mutations synonymes, mais aucune mutation non-synonyme (250). L'allèle A578S est le plus répandu en Afrique, mais les raisons de sa sélection restent inconnues puisqu'il n'a jamais été

associé à un retard de clairance après traitement à l'ART où à une perte de sensibilité à l'ART *in vitro* (251).

Les parasites isolés présentaient aussi un profil de sensibilité à la PPQ. Les 148 isolats testés présentaient tous une seule copie du gène *Pm2*. De plus, tous les isolats testés en PSA étaient susceptibles à la PPQ. L'amplification du gène *Pm2* a été retrouvée dans d'importantes proportions dans certains pays d'Afrique comme le Burkina Faso ou l'Ouganda (165,166). Ce marqueur n'a cependant jamais été associé à la résistance à la PPQ ou à des échecs cliniques à la DHA-PPQ en Afrique. Afin de compléter cette étude moléculaire, il serait donc intéressant d'observer la présence de mutations dans le gène *Crt* associées à la résistance à la PPQ en Asie.

L'énumération des parasites à Jour 0, 2 et 3 sont encore en cours. Les données de densité parasitaire présentées dans l'article sont donc susceptibles d'évoluer. Les données phénotypiques seront aussi complétées. Les résultats collectés à ce jour permettent néanmoins de valider la bonne efficacité clinique de la DHA-PPQ au Cameroun. Les parasites semblent conserver leur sensibilité à l'ART et à la PPQ malgré une utilisation massive de ces molécules. Les marqueurs de résistance analysés (*K13* et *Pm2*) ne sont cependant probablement pas les plus adaptés à la surveillance moléculaire des résistances en Afrique, puisque qu'ils ont été associés à la résistance à l'ART et à la PPQ uniquement chez les parasites isolés en Asie. En l'absence de marqueurs moléculaires pertinents, la surveillance clinique et *in vitro* doit être maintenue au Cameroun et partout en Afrique, afin d'identifier précocement une potentielle émergence de résistance aux CTA. La résistance à la LM devrait notamment être surveillée de plus près, au vu du grand nombre de traitements AL contrefaits distribués au Cameroun. De plus, une proportion importante des patients éligibles avait été traitée à l'AL dans le mois précédent l'étude, ce qui pourrait indiquer une baisse de l'efficacité de cette combinaison.

3. Article

Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine in patients with non-complicated *P. falciparum* malaria in Yaoundé, Cameroun

Mélissa Mairet-Khedim, Sandrine Nsango, Christelle Ngou, Sandie Menard, Nimol Khim, Malen Ken, Laure Otam, Francis Abega, Lawrence Ayong, Isabelle Morlais, Benoit Witkowski, Antoine Berry.

En cours de finalisation.

Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine in patients with non-complicated *P. falciparum* malaria in Yaoundé, Cameroun

Mélissa MAIRET-KHEDIM ^{1,2,8 †}, Sandrine NSANGO ^{3,4 †}, Christelle NGOU ^{3,4 †}, Sandie MENARD ¹, Nimol KHIM ², Malen KEN ², Laure OTAM ^{3,4}, Francis ABEGA ⁵, Lawrence AYONG ⁶, Isabelle MORLAIS ⁷, Benoit WITKOWSKI ^{2,8 ‡}, Antoine BERRY^{‡ 1*}

Author information

1. Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université de Toulouse, Toulouse, France
2. Malaria Molecular Epidemiology Unit, Institut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia
3. Laboratoire d'Entomologie Médicale, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Yaoundé, Cameroon
4. Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala, Douala, Cameroon
5. Dispensaire de Nkol-Eton, BP894, Yaounde, Cameroon
6. Malaria Research Unit, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon
7. UMR MIVEGEC, IRD 224-CNRS5290-UM, Institut de Recherche pour le développement, Montpellier, France
8. Malaria Translational Research Unit, Institut Pasteur, Paris, France

† Authors contributed equally

‡ Co-senior authors

* Corresponding author

Abstract

Background: Dihydroartemisinin/piperaquine (DHA/PPQ) is increasingly used for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Western and Central Africa. The clinical efficacy of this combination in Cameroon is poorly documented. DHA-PPQ resistance readily appeared and spread in South East Asia, therefore an active surveillance of DHA-PPQ therapeutic efficacy in Africa is essential.

Objective: This study aimed to evaluate DHA-PPQ clinical efficacy in Cameroon, in association with the molecular and phenotypic susceptibility profile of the collected isolates to DHA and PPQ.

Method: 152 patients presenting non-complicated *P. falciparum* malaria were enrolled in a single arm therapeutic efficacy study in Yaoundé. DHA-PPQ efficacy was determined based on a 42 days follow-up. Parasite reinfections were discriminated from recrudescence by PCR correction. *Kelch13* gene polymorphisms and *Plasmepsin2* gene amplification were determined as molecular markers of resistance to DHA and PPQ. The susceptibility of the collected isolates to DHA and PPQ was determined using validated *in vitro* survival assays.

Results: The efficacy of DHA-PPQ treatment in the study was 100% after PCR correction. 96% of the samples presented a wild type allele of the *Kelch13* gene. Among the 4% of *Kelch13*-mutants isolates, 2% presented the A578S non-synonymous mutation (n=3). This mutation was not associated with resistance to DHA. No duplication of the *Plasmepsin2* gene was observed. In accordance with clinical outcome, all the samples tested *in vitro* by survival assays were highly sensitive to DHA and PPQ.

Conclusion: DHA-PPQ has demonstrated an excellent therapeutic efficacy in this study. In addition, no parasite with reduced susceptibility to DHA and PPQ have been detected.

Background

Artemisinin-based combination therapies (ACTs) have contributed to reduce the global malaria prevalence and mortality. Dihydroartemisinin/piperaquine (DHA/PPQ) is an increasingly implemented antimalarial combination in Africa. Its efficacy has been highlighted in several countries in Central and Western Africa (1–6). In Cameroon, DHA/PPQ is unofficially one of the most commonly used ACT for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria since 2012. This feature could be attributed to the unpopularity of the two first-line treatments implemented in 2004, artesunate/amodiaquine (ASAQ) and artemether/lumefantrine (AL) (7). DHA-PPQ resistance rapidly emerged and spread in Cambodia after 2010. DHA-PPQ resistance is associated with a multi-resistance to artemisinin (ART) and PPQ. Molecular markers are now available to facilitate the survey of resistance. ART resistance has been previously associated with different polymorphisms in the *Kelch13* gene (8) while PPQ resistance has been associated with the amplification of the *Plasmeprin2* gene, and specific polymorphisms in the *Pfcr1* gene (9,10).

Despite evidence of parasites carrying *Plaspeprin2* amplification (11,12), clinical resistance to DHA/PPQ has not been evidenced yet in Africa. Experience from South East Asia has demonstrated a rapid emergence and spread of resistant parasites upon DHA-PPQ implementation (13–17). Therefore and considering the largescale use of DHA-PPQ in Cameroon, investigation on possible resistance emergence to DHA/PPQ is critical. We propose here for the first time a standardized clinical and parasitological evaluation of DHA-PPQ efficacy in Cameroon.

Methods

Study site and participants

This study was conducted from January to May 2018 in Nkol-Eton Health Center, located in Yaoundé *intra-muros*, capital city of Cameroon. It was proposed to patients consulting for presumption of malaria infection to participate in the study. After approbation of an informed consent, the patients have undergone a clinical examination. Patients ≥ 5 years old, with >1000 asexual parasites per μl of blood were enrolled. Pregnant women, and patients presenting symptoms of severe malaria or vomiting preventing any oral treatment were excluded. In addition, patients who had any antimalarial treatment within a 21-days period before consultation, and for whom DHA-PPQ is contraindicated were excluded as well.

Study procedure

The study was designed according to the standard WHO protocol for surveillance of anti-malarial drug efficacy. Eligible patients were treated daily with DHA/PPQ 40/320 or 20/160 mg tablet (Malacur®, Elder Pharmaceuticals LTD, India) for three days (treatment regimen described in table 1) (18). The first dose was administered following Directly Observed Treatment (DOT) at Day 0. A phone call was given at Day 1 to ensure the second dose was taken. At Day 2, patients were given the last dose on DOT. An impregnated mosquito net was given to each patient to limit the risk of reinfection.

Patients were followed-up for 42 days after treatment. Patients were asked to return the hospital at days 2, 3, 7, 21, 28 and 42 for clinical assessment and finger-prick blood samples. At days 14 and 35, a clinical assessment was carried out by phone call. During the consultations, a medical worker examined the physical symptoms, and sample finger blood to do thick smear. Intravenous blood was collected before treatment, on the day of failure. Patient lost to follow-up were excluded from the per protocol analysis.

Parasitological outcome

Patient blood was sampled at each consultation to perform thick smears. *P. falciparum* positivity was determined based on parasite counts on Giemsa-stained thick smear, determined by two qualified microscopists. Parasitaemia was determined by counting the number of asexual parasites for 500 white blood cells and the density estimated considering 8000 white blood cells per μl . Parasite positivity at day 3 was determined as a metric of reduced artemisinin clinical efficacy of artemisinin.

Clinical outcome

The primary efficacy outcome was adequate clinical and parasitological response (ACPR) at day 42, adjusted for reinfection using PCR-genotyping. Patients presenting no parasites all along the follow up were classified as ACPR. Failures detected up to day 3 were assigned to early treatment failure group (ETF), failure posterior to day 4 were assigned to late treatment failure group (LTF). All the patients presenting a potential treatment failure were treated with ASAQ at the day of failure.

Genotyping

Genotyping was performed by PCR to discriminate recrudescence from new infections for all treatment failures observed. Venous blood was sampled from patients on the day of enrolment and on the day of failure. The polymorphisms in the merozoite surface protein 1 (*Msp-1*), merozoite surface protein 2 (*Msp-2*), and glutamate rich-protein (*Glurp*) genes were compared using nested-PCR as previously described (19). A treatment failure was considered recrudescence if all *Msp-1*, *Msp-2*, and *Glurp* allele profiles present at the day of failure had been identical at the day of treatment initiation. For different allele profiles, the parasitological failure was classified as a new infection.

Resistance molecular markers determination

DNA was extracted from venous blood samples obtained at patient enrolment (day 0) using the spin protocol of QIAamp Mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's recommendations. PCR amplification of *Kelch13*-propeller domain was performed, as previously described (8). Sanger sequencing of PCR products was performed with ABI 3130xl Genetic Analyzer (Genoscreen, France). Sequences were then compared to 3D7 reference strain sequence (*Kelch13*-WT) with BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.3). *Plasmepsin2* gene copy number was assessed by quantitative PCR, following the method previously described, with modification of the hybridization temperature to 63°C (10). Strains from Cambodia were used as amplification control.

***P. falciparum* culture adaptation & phenotyping**

Venous blood was collected in Acide Citrate Dextrose (ACD) vacutainers at day 0 before the patients were treated, and on the day of failure. Samples were cryopreserved in glycerolite 57 (Baxter) until culture adaptation. *P. falciparum* isolates were adapted in RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) complemented with 0.5% AlbumaxII, (Gibco, New Zealand), 2% of Hypoxanthine (c-c-pro), 2.5% of HEPES (Gibco, New Zealand) and 2.5% of decomplexed AB plasma (Cambodian blood bank). Culture conditions were set at 2% hematocrit (Cambodian blood bank), 5% O₂ and 5% CO₂.

Susceptibility to DHA was determined using the RSA assay (20). 0-3-h post-invasion rings were isolated from the culture, adjusted to 1% parasitaemia, and exposed to 700 nM of DHA for 6 hours. After drug washout and 66 hours of culture in a drug-free medium, the proportion of viable parasites was enumerated in the DHA-exposed condition, and reported to the proportion of viable parasites in 0.1% of Dimethylsulfoxide (DMSO, drug-free control, Sigma, Singapore) to determine a parasite survival percentage. PPQ susceptibility was determined by Piperaquine Survival Assay (PSA^{0-3h}), following the described method (10). 0-3-h post-

invasion rings adjusted to 1% parasitaemia were exposed to 200 nM of PPQ or 0.5% lactic acid as drug-free control for 48 hours. After a total of 72 hours in culture, a survival rate was determined by comparing the proportion of viable parasites in exposed and non-exposed conditions.

DHA and PPQ resistant isolates previously collected in Cambodia & reference strain 3D7 (MR4) were used as control. DHA and PPQ were provided by WWARN.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed using Graphpad Prism 7.00 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Data that were not normally distributed were displayed as median along with interquartile ranges and were compared with Mann–Whitney U test for two group comparisons. Proportions were compared using the χ^2 test or the Fisher's exact test. A P value <0.05 was considered as significant.

Ethics

The “Comité National d’Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine” approved the study (CNERSH, statement number 2018/09/1092/CE/CNERSH/SP). All participants have signed an informed consent form.

Results

DHA-PPQ therapeutic efficacy

152 patients presenting non-complicated *P. falciparum* infections were included in this study (Figure 1). The patients were aged from 5 to 73 years old (median= 14). Male and female were equally distributed (44.7% of female and 55.3% of males). The median weight was 50 kg. The median temperature was 37.6°C. The main symptoms were associated with malaria and were: high temperature, headache, vomiting, abdominal pain, arthralgia and chills. 6.6% of the patients were treated for a previous malaria infection in the year before the study (table 2). Twelve patients were furtherly lost in follow up and consequently excluded from the analysis. Similarly, 2 patients were excluded due to manifestation of non-malaria related pathologies (figure 1).

138 patients have been followed until day 42. 11/138 patients have experienced late parasitological failure (Table 3). No early failure was monitored. After PCR correction, all the recurrences were attributable to reinfections. The DHA/PPQ efficacy before PCR-correction was 92%. After PCR-correction, the efficacy of DHA-PPQ was 100% (figure 2).

The presence of asexual forms of *P. falciparum* was observed on 9/138 (6.5%) patient's thick smear at Day 3 after enrollment. 5/138 (3.6%) patients presented gametocytes at Day 3. The presence of for asexual stages at Day 3 is not relevant for this study considering the absence of parasitological failure.

Molecular markers of resistance

Sequences of *Kelch13* gene coding for propeller domain were successfully determined for 150/152 samples (Table 4). The sequences were compared to the 3d7 *Kelch13* wild type (WT) reference sequence. 144/150 (96%) isolates presented a WT sequence of the *Kelch13* gene. 3/150 (2%) presented a synonymous mutation in the *Kelch13* gene, and 3/150 (2%) samples

presented a non-synonymous mutation in the gene. The only non-synonymous mutation detected was A578S (n=3). Mutations in the *Kelch13* gene were not associated with treatment failure neither parasite positivity at day 3.

Plasmeprin2 copy number was successfully determined for 148/152 isolates (Table 4). 0/148 (0%) isolates presented an amplification of the gene (figure 3). The median number of copy was 1.13 [IQR: 0.023 – 1.2] for the 148 isolates collected at the day of enrolment. The copy number variation range was [0.75-1.37]. The median number of copy for the control PPQ-resistant strains was 2.09 [1.77 – 2.56].

***In vitro* susceptibility to DHA and PPQ**

Among the 152 blood samples collected before treatment with DHA-PPQ, 28 were successfully adapted in culture. The survival rates of each isolates after DHA and PPQ collection were determined (figure 4). All 28 isolates tested were sensitive to DHA and PPQ, as well as 3d7. Median PSA susceptibility was 0% [IQR: 0 – 0]. Median RSA susceptibility was 0% [IQR: 0 – 0]. Median RSA for *Kelch13*-A578S mutant was 0%. The control strains from Cambodia (DHA and PPQ resistant) had a median RSA of 10% [IQR: 7.72 – 16.84]. Median PSA was 60.79% [IQR: 49 – 64.3] (figure 4).

Discussion

This study demonstrated the excellent efficacy of DHA/PPQ for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Cameroon.

Two previous studies conducted between 2003 and 2013 had already reported a good efficacy of this treatment (95% ACPR after 28 days follow-up (21), and 96.3% ACPR after 42 days (22)). However, those results were obtained before DHA-PPQ implementation. Since then, the use of DHA-PPQ has drastically increased. It was therefore necessary to update de clinical data on DHA-PPQ efficacy in Cameroon, considering the recent spread of DHA-PPQ-resistant parasites in South East Asia.

The results obtained in thin study were in line with the high PCR-corrected efficacy of DHA-PPQ previously reported in Cameroon, and in other African countries between 2006 and 2016 (Mali (99.3%), Uganda (98%), Kenya (96%), Zambia (93%), Angola (100%)) (1–3, 6, 15). The protocol efficacy before PCR correction (92%), was in the same range than results obtained in previous studies in Africa (>90%) (1,3,6,23).

The high efficacy of DHA-PPQ in Cameroon is consistent with the absence of molecular markers associated with DHA-PPQ resistance in Asia. In opposition with Burkina Faso and Uganda, where the prevalence of *Plasmepsin2* gene amplification was more than 30% (11,12), no *Plasmepsin2* duplication was detected among the 148 samples tested. Since mutations in the *Pfcr1* gene (T93S, H97Y, F145I, I218F, M343I and G353V) have been recently associated with PPQ resistance in South East Asia (9), it would be necessary to observe the prevalence of these mutations in Cameroon. However, the high sensitivity of collected isolates to DHA and PPQ within this study suggests the absence of such polymorphisms.

Samples positive for asexual forms at Day 3 were not associated with clinical failures. This result confirms that there is no sign of DHA resistance among the collected samples, in line

with the absence of *Kelch13* relevant polymorphisms. The presence of gametocytes at Day 3 indicates a possible transmission of parasites post treatment. This observation suggests that the use of primaquine could be envisaged in Africa.

This study confirms that the A578S mutation is not associated with ART resistance. 2% of the samples carried the A578S mutation, already reported in several studies in Africa, India and Bangladesh at low proportions (25–28). The percentage of *Kelch13*-A578S isolates collected during this study was interestingly higher than in 2015 in Cameroon, from the same Health Center in Yaoundé, where only synonymous mutations were found in the *Kelch13* gene among 93 samples tested (29). However, the A578S polymorphism was not associated with decreased susceptibility to DHA *in vitro*, since the three samples tested by RSA^{0-3h} presented a 0% survival rate. Parasite clearance delay (expressed by positivity at day 3) has neither been observed for the patients infected with *Kelch13*-A578S isolates, in accordance with previous studies (25,28). The selection of this allele could be explained by a transmission, or a fitness advantage for the parasites in carrying this mutation.

However, the molecular markers explored in this study are associated with resistance to DHA and PPQ in Asia only. *Kelch13* mutations detected in Africa were never associated with resistance to ART, and *Plasmepsin2* duplication was neither associated with PPQ resistance. Since parasites from Asia and Africa belong to different phylogenetic groups, the possibility of independent resistance markers emerging in Africa cannot be excluded (32). Therefore, *Kelch13* and *Plasmepsin2* may not be the only markers for surveillance of DHA-PPQ in Africa (33).

Conclusion

This study demonstrates the high clinical efficacy of DHA/PPQ in Cameroun, and fulfills the WHO requirements. For now, there is no evidence of ART or PPQ resistance emergence in Cameroon. Since resistance to DHA-PPQ rapidly spread in South East Asia, the efficacy of this treatment should nonetheless be closely monitored in Africa.

Bibliography

1. Agarwal A, McMorro M, Onyango P, Otieno K, Odero C, Williamson J, et al. A randomized trial of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine in the treatment of uncomplicated malaria among children in western Kenya. *Malar J.* déc 2013;12(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-254>
2. Dama S, Niangaly H, Djimde M, Sagara I, Guindo CO, Zeguime A, et al. A randomized trial of dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Malar J.* 5 oct 2018;17(1):347.
3. Yeka A, Dorsey G, Kanya MR, Talisuna A, Lugemwa M, Rwakimari JB, et al. Artemether-Lumefantrine versus Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treating Uncomplicated Malaria: A Randomized Trial to Guide Policy in Uganda. Sutherland CJ, éditeur. *PLoS ONE.* 11 juin 2008;3(6):e2390.
4. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *The Lancet.* 7 avr 2018;391(10128):1378-90.
5. Zwang J, Ashley EA, Karema C, D'Alessandro U, Smithuis F, Dorsey G, et al. Safety and Efficacy of Dihydroartemisinin-Piperaquine in *Falciparum* Malaria: A Prospective Multi-Centre Individual Patient Data Analysis. Diemert DJ, éditeur. *PLoS ONE.* 29 juill 2009;4(7):e6358.
6. Nambozi M, Van Geertruyden J-P, Hachizovu S, Chaponda M, Mukwamataba D, Mulenga M, et al. Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Zambian children. *Malar J* [Internet]. déc 2011 [cité 14 janv 2020];10(1). Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-50>
7. [fy-2019-cameroon-malaria-operational-plan.pdf](#) [Internet]. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.pmi.gov/docs/default-source/default-document-library/malaria-operational-plans/fy19/fy-2019-cameroon-malaria-operational-plan.pdf?sfvrsn=4>
8. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2 janv 2014;505(7481):50-5.
9. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kümpornsin K, et al. Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperaquine. *Nat Commun.* 17 août 2018;9(1):1-13.
10. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis.* févr 2017;17(2):174-83.
11. Leroy D, Macintyre F, Adoke Y, Ouoba S, Barry A, Mombo-Ngoma G, et al. African isolates show a high proportion of multiple copies of the *Plasmodium falciparum* plasmepsin-2 gene, a piperaquine resistance marker. *Malar J* [Internet]. déc 2019 [cité 14 janv 2020];18(1).

Disponible sur: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-019-2756-4>

12. Inoue J, Silva M, Fofana B, Sanogo K, Mårtensson A, Sagara I, et al. *Plasmodium falciparum* Plasmepsin 2 Duplications, West Africa. *Emerg Infect Dis.* août 2018;24(8):1591-3.
13. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* mars 2016;16(3):357-65.
14. Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C. Dihydroartemisinin–Piperaquine Failure in Cambodia. *N Engl J Med.* 31 juill 2014;371(5):484-5.
15. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2015;59(8):4719-26.
16. Dhingra SK, Gabryszewski SJ, Small-Saunders JL, Yeo T, Henrich PP, Mok S, et al. Global Spread of Mutant PfCRT and Its Pleiotropic Impact on *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance and Fitness. *mBio* [Internet]. 30 avr 2019 [cité 24 déc 2019];10(2). Disponible sur: <https://mbio.asm.org/content/10/2/e02731-18>
17. Pluijm RW van der, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis.* 1 sept 2019;19(9):952-61.
18. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2015.
19. 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.* 1 févr 2003;68(2):133-9.
20. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* déc 2013;13(12):1043-9.
21. Whegang SY, Tahar R, Foumane VN, Soula G, Gwét H, Thalabard J-C, et al. Efficacy of non-artemisinin- and artemisinin-based combination therapies for uncomplicated *falciparum* malaria in Cameroon. *Malar J.* 19 févr 2010;9:56.
22. Nji AM, Ali IM, Moyeh MN, Ngongang E-O, Ekollo AM, Chedjou J-P, et al. Randomized non-inferiority and safety trial of dihydroartemisin-piperaquine and artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroonian children. *Malar J.* 28 janv 2015;14:27.
23. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, et al. Efficacy of Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of

Uncomplicated Malaria in Children in Zaire and Uíge Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1):437-43.

24. Whegang Youdom S, Chiabi A, Basco LK. Monitoring the Efficacy and Safety of Artemisinin-Based Combination Therapies: A Review and Network Meta-analysis of Antimalarial Therapeutic Efficacy Trials in Cameroon. *Drugs RD.* mars 2019;19(1):1-14.

25. Maïga-Ascofaré O, May J. Is the A578S Single-Nucleotide Polymorphism in K13-propeller a Marker of Emerging Resistance to Artemisinin Among *Plasmodium falciparum* in Africa? *J Infect Dis.* 1 janv 2016;213(1):165-6.

26. Mohon AN, Alam MS, Bayih AG, Folefoc A, Shahinas D, Haque R, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009–2013). *Malar J.* 18 nov 2014;13(1):431.

27. Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Updates on k13 mutant alleles for artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Immunol Infect.* 1 avr 2018;51(2):159-65.

28. 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.* 23 juin 2016;374(25):2453-64.

29. Menard S, Tchoufack JN, Maffo CN, Nsango SE, Iriart X, Abate L, et al. Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates. *Malar J.* 26 nov 2016;15(1):572.

30. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, et al. Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Select Distinct Alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* Gene in Tanzanian Children Treated for Uncomplicated Malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 2007;51(3):991-7.

31. Borges S, Cravo P, Creasey A, Fawcett R, Modrzynska K, Rodrigues L, et al. Genomewide Scan Reveals Amplification of *mdr1* as a Common Denominator of Resistance to Mefloquine, Lumefantrine, and Artemisinin in *Plasmodium chabaudi* Malaria Parasites[∇]. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2011;55(10):4858-65.

32. MalariaGEN *Plasmodium falciparum* Community Project. Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. Neher RA, éditeur. *eLife.* 4 mars 2016;5:e08714.

33. Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Robert MG, Madamet M, Pradines B. Are k13 and plasmepsin II genes, involved in *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine in Southeast Asia, reliable to monitor resistance surveillance in Africa? *Malar J.* 23 août 2019;18.

Tables

Table 1: Posology of DHA-PPQ treatment based on body weight.

Body Weight	Number of pill per day	Total number of pill to complete the treatment
5-7 kg	1 x 20/160 mg	3 of 20/160 mg
8-10 kg	1.5 x 20/160 mg	4, 5 of 20/160 mg
11-16 kg	2 x 20/160 mg	6 of 20/160 mg
17-24 kg	1.5 x 40/320 mg	4,5 of 40/320 mg
25-35 kg	2 x 40/320 mg	6 of 40/320 mg
36-59 kg	3 x 40/320 mg	9 of 40/320 mg
60 - 79 kg	4 x 40 / 320 mg	12 à 40/320 mg
>80 kg	5 x 40 / 320 mg	15 à 40/320 mg

Table 2: Clinical features of patients treated with DHA-PPQ at the day of enrolment.

Patients clinical features	Number of patients	Median or frequency
Number of patients	152	
Median age (years) (IQR)	-	14 [9 – 21]
Males (%)	84	55.3
Females (%)	68	44.7
Median body weight (kg) (IQR)	-	50 [31 – 66]
Median temperature (°C) (IQR)	-	37.6 [37 – 39]
Symptoms		
Fever (temperature >38°C, %)	69	45.4
Headache (%)	103	67.8
Vomiting (%)	51	33.6
Abdominal pain (%)	57	37.5
Arthralgia (%)	33	21.7
Chills (%)	34	22.4
Patients treated with antimalarial treatments the year before the study (%)	10	6.6
<i>P. falciparum</i> asexual parasite density (median parasitaemia, parasites/μL, IQR)	85	21217 [7532 – 48351]
Antimalarial dose (mg/kg/day)		
DHA median (IQR)	152	2.42 [2.22 – 2.73]
PPQ median (IQR)	152	19.39 [17.78 – 21.82]

Table 3: Parasitological outcome before and after PCR correction.

Parasitological outcome	Before PCR-correction		After PCR-correction	
	Number	Frequency	Number	Frequency
Early Parasitological Failure	0/138	0%	0/138	0%
Late Parasitological Failure	11/138	8%	0/138	0%
Adequate Parasitological Response	127/138	92%	0/138	0%

Table 4: Prevalence of the molecular markers associated with DHA and PPQ resistance.

Molecular markers of resistance	Associated drug	Number of events and frequency	
<i>Kelch13</i>	Artemisinin derivatives	WT allele	144/150 (96%)
		Synonymous mutations	3/150 (2%)
		Non-synonymous mutations (A578S)	3/150 (2%)
<i>Plasmepsin2/3</i>	Piperaquine	1 copy	148/148 (100%)
		>1.5 copies	0/148 (0%)

Figures

Figure 1: Patient's flow through the study.

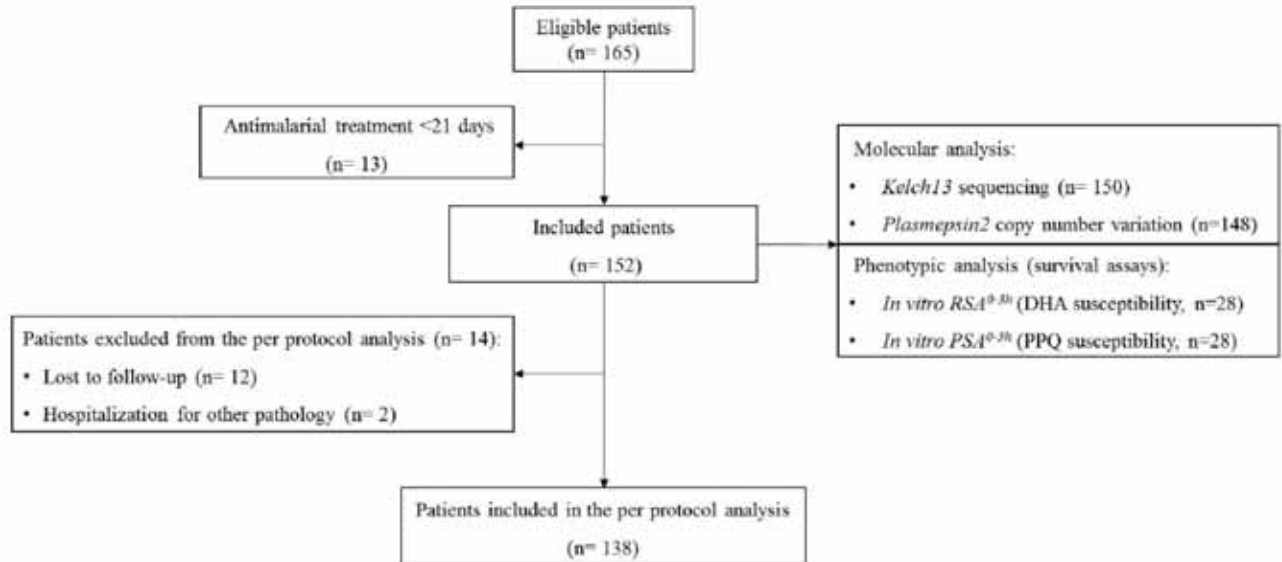
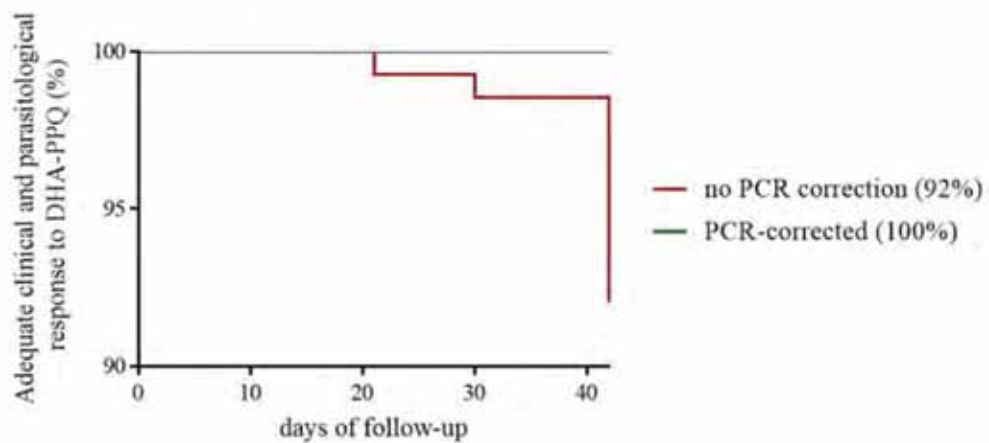


Figure 2: Clinical outcome after 42 days of patient follow-up, before and after PCR-correction. A Kaplan-Meier analysis was performed for 138 patients included in the per protocol analysis before PCR-correction and after PCR-correction. The number of clinical failures, associated with the day of failure are indicated.



Days of follow-up	21	30	42
Number of failure before PCR correction	1	1	9
Number of failure after PCR correction	0	0	0

Figure 3: Copy number variation for the *Plasmepsin2* gene. 148/152 samples collected at Day 0 were tested by qPCR. PPQ-resistant (PPQ-R) strains from Cambodia were used as control. The amplification threshold was fixed at >1.5 copies.

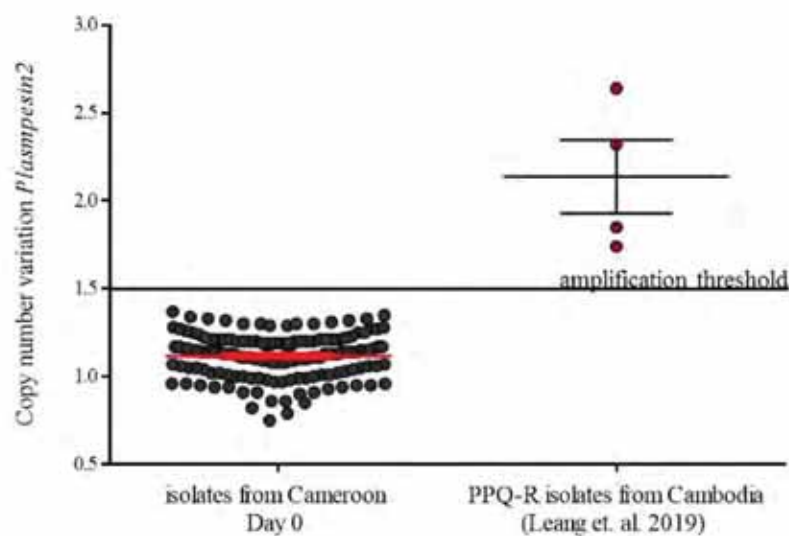
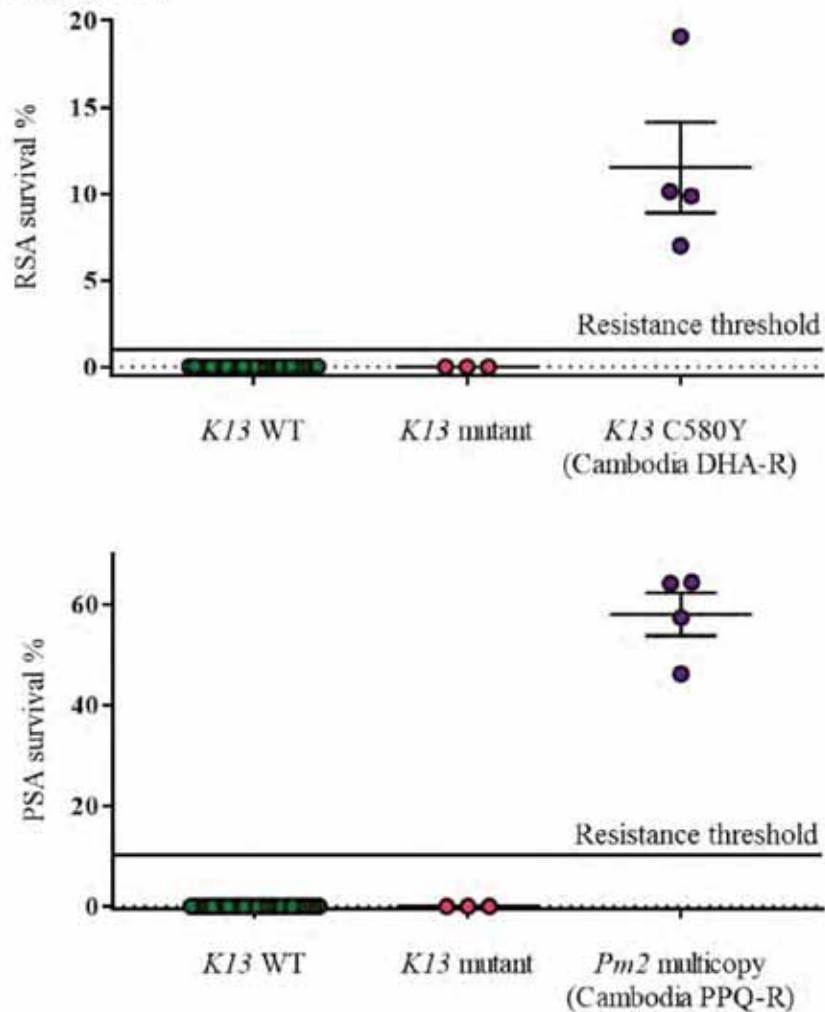


Figure 4: *In vitro* susceptibility of *P. falciparum* isolates collected in Cameroon to DHA and PPQ. RSA^{0-3h} and PSA^{0-3h} were performed on 25 *Kelch13*-WT isolates, and on the 3 *Kelch13*-A578S isolates from Cameroon. The threshold for DHA and PPQ resistance were 1% and 10% survival respectively. Resistant strains from Cambodia were used as resistance controls. Isolates from Cambodia had statistically lower susceptibility than isolates from Cameroon ($P < 0.05$ by Mann Whitney test). **DHA-R:** resistant to DHA. **PPQ-R:** resistant to PPQ. *Pm2*: *Plasmepsin2*.



II. NOUVELLES OPTIONS THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DU PALUDISME NON COMPLIQUÉ À *P. FALCIPARUM*

Depuis leur introduction au Cambodge, les CTA ont participé à diminuer considérablement la prévalence du paludisme. Cependant, la forte pression médicamenteuse exercée sur les parasites a conduit à l'émergence de résistances contre toutes les molécules utilisées ces vingt dernières années. Les données de surveillance de l'efficacité de l'AS-MQ présentées précédemment (partie 2- I.A) ont montré une résurgence de la résistance à cette combinaison. Il est donc primordial de tester de nouveaux composés capables de remplacer efficacement l'AS-MQ au Cambodge en cas d'augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. Peu de molécules ayant terminé leur phase de développement pharmaceutique sont aujourd'hui disponibles pour remplacer les CTA actuelles. Cette partie a étudié l'efficacité de plusieurs traitements alternatifs sur les parasites multi-résistants présents au Cambodge.

A. Efficacité de l'artésunate-pyronaridine associée à une dose unique de primaquine pour le traitement des infections non compliquées à *P. falciparum* au Cambodge

1. Introduction

L'OMS a recommandé l'utilisation du Pyramax (AS-PYR) associé à une dose unique de PQ dans les zones de multi-résistance aux antipaludiques comme l'Asie du Sud Est. Au Cambodge, l'AS-PYR a d'abord été testée seule en 2014-2015 à l'Ouest du Cambodge (252). L'efficacité de cette combinaison était alors inférieure au seuil de 90% de de réponse clinique et parasitologique adéquate (ACPR) à jour 42 (corrigé par PCR) recommandé par l'OMS. Le travail ci-après rapporte l'efficacité de l'AS-PYR associé à une dose unique de PQ à l'Est (article 1) et à l'Ouest du Cambodge (article 2). Les deux études présentées décrivent l'efficacité clinique de ce traitement, ainsi que la prévalence des principaux marqueurs moléculaires de résistance au Cambodge (*K13*, *Pm2/3* et *Mdr1*). La susceptibilité des isolats à la PYR a aussi été observée pour les échantillons collectés à l'Est du Cambodge. Ces deux études

ont été réalisées en collaboration avec le « National Center for Parasitology, Entomology and Malaria » (CNM, Cambodge) et l'OMS. Toutes les données moléculaires et *in vitro* ont été générées à l'Institut Pasteur du Cambodge.

2. Discussion/conclusion

L'efficacité de l'AS-PYR associée à une dose unique de PQ sur les infections non compliquées à *P. falciparum* à jour 42 était supérieure à 95% aussi bien à l'Est (Ratanakiri et Mondulhiri) qu'à l'Ouest du Cambodge (Kampong Speu et Pursat). L'article 2 confirme aussi l'efficacité du traitement sur les infections à *P. vivax* à l'Ouest du Cambodge. Ces résultats sont largement au-dessus du seuil d'efficacité de 90% d'ACPR à jour 42 fixé par l'OMS, et valident ainsi l'AS-PYR + PQ comme possible traitement de première ligne au Cambodge. La grande majorité des échantillons collectés au cours de ces deux études étaient *K13*-mutants et *Pm2*-amplifiés. Ces études ont en effet été en 2017-2018, juste après la réintroduction de l'AS-MQ. Les parasites présentaient donc toujours un génotype de résistance à la DHA-PPQ. L'AS-PYR + PQ était efficace même sur ces souches multi-résistantes. De plus, aucune baisse de sensibilité à la PYR en lien avec les marqueurs moléculaires de résistance n'a été observée *in vitro* (article 1). Une première étude avait été réalisée en 2014-2015 à l'Ouest du Cambodge en testant seulement l'AS-PYR sans PQ sur les infections non compliquées à *P. falciparum*. L'efficacité du traitement était alors nettement moins importante (88% d'ACPR à jour 42 dans l'ensemble des provinces étudiées).

La PQ pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité de ce traitement, en l'augmentant de près de 10%. La PQ est capable de bloquer la transmission du parasite de l'Homme au moustique pendant plusieurs jours après traitement, mais son action sur les formes asexuées n'a toutefois jamais été démontrée. Les paramètres pharmacocinétiques de la PQ n'ont pas été étudiés ; il est également possible que des variations interindividuelles du niveau de PQ aient eu un impact sur l'efficacité de la molécule.

L'efficacité de l'AS-PYR + PQ observée au Cambodge est similaire à celles observée en Afrique, où les parasites sont sensibles aux CTA (229,253–255). La bonne efficacité de l'AS-PYR + PQ a aussi été récemment démontrée au Vietnam (227). Cela confirme l'absence d'impact des profils de résistance circulant au Cambodge sur l'efficacité de cette combinaison, renforçant son intérêt comme traitement de première intention.

En conclusion, l'AS-PYR + PQ remplit les conditions d'efficacité et de sûreté recommandées par l'OMS pour son utilisation comme traitement de première ligne, et demeure à ce jour la seule nouvelle option thérapeutique capable de remplacer l'AS-MQ au Cambodge.

3. Articles

Article 1:

Efficacy and Safety of Pyronaridine-Artesunate plus Single-Dose Primaquine for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Eastern Cambodia

Rithea Leang, Melissa Mairet-Khedim, Huch Chea, Rekol Huy, Nimol Khim, Denis Mey Bouth, Maria Dorina Bustos, Pascal Ringwald, Benoit Witkowski

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2019 ; 63(3):e02242-18. **DOI:** 10.1128/AAC.02242-18

Article 2:

Efficacy and Safety of Pyronaridine-Artesunate plus Single-Dose Primaquine for the Treatment of Malaria in western Cambodia

Rithea Leang, Nimol Khim, Huch Chea, Rekol Huy, Melissa Mairet -Khedim, Denis Mey Bouth, Maria Dorina Bustos, Pascal Ringwald, Benoit Witkowski

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2019 ; 63(10):e01273-19. **DOI:** 10.1128/AAC.01273-19



Efficacy and Safety of Pyronaridine-Artesunate plus Single-Dose Primaquine for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Eastern Cambodia

Rithea Leang,^a Melissa Mairet-Khedim,^b Huch Chea,^a Rekol Huy,^a Nimol Khim,^b Denis Mey Bouth,^c Maria Dorina Bustos,^d Pascal Ringwald,^e Benoît Witkowski^b

^aNational Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia

^bInstitut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia

^cWorld Health Organization, Phnom Penh, Cambodia

^dWorld Health Organization, Bangkok, Thailand

^eWorld Health Organization, Geneva, Switzerland

ABSTRACT In Cambodia, multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* undermines the treatment of uncomplicated malaria, and new therapeutic options are needed. Pyronaridine-artesunate has not previously been evaluated in eastern Cambodia. We conducted a single-arm, open-label, prospective study between July and December 2017 at the Koh Gnek (Mondulkiri) and Veun Sai (Rattanakiri) health centers in eastern Cambodia. Eligible patients were aged ≥ 7 years (females, ages 12 to 18 years, were excluded), weighing ≥ 20 kg, with microscopically confirmed *P. falciparum* mono-infection and fever. Oral pyronaridine-artesunate was administered once daily for 3 days, dosed according to body weight, plus a single dose of primaquine on day 0. Sixty patients were recruited to Koh Gnek, and 61 patients were recruited to Veun Sai. The primary outcomes, i.e., the day 42 PCR-adjusted adequate clinical and parasitological responses (ACPRs), were 98.3% (95% confidence interval [CI], 88.4 to 99.8) in Koh Gnek and 96.7% (95% CI, 87.3 to 99.2) in Veun Sai (Kaplan-Meier). In a per-protocol analysis, the proportions of patients with day 42 PCR-adjusted ACPRs were 98.3% (57/58; 95% CI, 90.8 to 100.0) at Koh Gnek and 96.7% (58/60; 95% CI, 88.5 to 99.6) at Veun Sai. The *Kelch13* (C580Y) mutation was present in 70.0% (77/110) of isolates. The copy numbers were increased in 61.3% (73/119) of isolates for *Pfpm2* and in 1.7% (2/119) for *Pfmdr1*. There was no relationship between outcome and the 50% inhibitory concentration of pyronaridine. Adverse events were consistent with malaria, and there were no serious adverse events. Pyronaridine-artesunate has high efficacy in eastern Cambodia and could be used to increase the diversity of antimalarial therapy in the region. (This study is registered in the Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR] under no. ACTRN12618001300268.)

KEYWORDS Cambodia, *Plasmodium falciparum*, artemisinin, drug resistance, pyronaridine-artesunate

The treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Cambodia is increasingly compromised by the spread of parasites exhibiting multiresistance to both the artemisinin and partner components of artemisinin-based combination therapy (ACT). These multidrug-resistant *P. falciparum* strains have been detected in four South-East Asian countries and, to prevent their spread, a malaria elimination program was initiated across the Greater Mekong subregion (1, 2). However, the success of this program depends on having effective antimalarial drug treatments available. Currently, there are no alternative antimalarial drugs that achieve the high efficacy and good tolerability of ACTs.

Citation Leang R, Mairet-Khedim M, Chea H, Huy R, Khim N, Mey Bouth D, Dorina Bustos M, Ringwald P, Witkowski B. 2019. Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate plus single-dose primaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in eastern Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e02242-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02242-18>.

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Pascal Ringwald, ringwaldp@who.int.

RL and M.M.-K. contributed equally to this article.

Received 24 October 2018

Returned for modification 25 November 2018

Accepted 17 December 2018

Accepted manuscript posted online 2 January 2019

Published 26 February 2019

Artemisinin resistance was first identified in Cambodia in 2006 (3), though subsequent identification of the *Kelch13* (*K13*) molecular marker indicated that it emerged as early as 2001 (4, 5). Artemisinin resistance by itself is characterized by delayed parasite clearance, without affecting clinical efficacy rates (6). However, once combination with resistance to the partner drug emerges, clinical efficacy rapidly declines, and this pattern has been seen repeatedly in Cambodia as multidrug-resistant strains have emerged and spread.

Artesunate-mefloquine was the first ACT introduced to Cambodia in 2000. Mefloquine resistance was already evident in western Cambodia at this time, and widespread use of the combination led to the selection of multidrug-resistant strains, with high treatment failure rates observed in western Cambodia by 2004 (7, 8). An increased *Pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1) gene copy number was validated as a molecular marker for mefloquine resistance (9, 10). In response to these findings, dihydroartemisinin-piperaquine was introduced as first-line therapy in Pailin province western Cambodia in 2008 and nationwide in 2010. However, piperaquine resistance rapidly emerged leading to high treatment failure rates in some regions. For example, a study conducted in 2011 to 2013 found that the proportion of patients with recrudescence was significantly higher in western (15.4%) than in eastern (2.5%) Cambodia ($P < 0.001$) (11). Similarly, data from 2012 and 2013 reported the risk of recrudescence by day 63 as 46% (37/81) in Pursat, a focus of drug resistance; 16% (10/63) in Preah Vihear, where artemisinin resistance was emerging; and 2% (1/60) in Rattanakiri, where artemisinin resistance was rare (12). Recently, increased copy number of *Pfpm2* (*P. falciparum* plasmepsin 2) has been validated as a molecular marker for piperaquine resistance, and this is often associated in Cambodia with the *K13* marker, leading to high failure rates (13). Artesunate-mefloquine was reintroduced in Cambodia as first-line therapy in 2014. In areas of where dihydroartemisinin-piperaquine failure is common, there is a low prevalence of *P. falciparum* strains with increased *Pfmdr1* copy number, and artesunate-mefloquine efficacy is currently maintained. However, it is clear that this is a precarious situation, with both first-line treatment options having been previously abandoned because of drug resistance.

Pyronaridine-artesunate has high efficacy in uncomplicated *P. falciparum* malaria in Asia and Africa and is included on the World Health Organization (WHO) essential medicines list and is WHO prequalified (14–21). However, in a multicenter phase 3 randomized clinical trial conducted in 2007 and 2008, among 211 patients from Pailin, the risk of recrudescence on day 42 with pyronaridine-artesunate was 10.2% (95% confidence interval [CI], 5.4 to 18.6) (17). Also, the parasite clearance time was 64.1 to 64.2 h in Cambodia versus 16.0 to 38.9 h at all other centers, a finding suggestive of artemisinin resistance (17). In a more recent, single-arm study in 123 patients (2014 and 2015), the risk of recrudescence on day 42 was 16.0% (95% CI, 8.3 to 29.4) in Pailin and 10.2% (95% CI, 4.7 to 21.1) in Pursat (22). However, all of these data are from known foci of drug resistance in western Cambodia.

It is important for the Cambodia National Malaria Program to verify whether the above findings reflect a genuinely lower efficacy for pyronaridine-artesunate across the country or whether efficacy is maintained in areas where pyronaridine-artesunate has never been evaluated. The present study examines pyronaridine-artesunate efficacy in two regions of eastern Cambodia: (i) Koh Gnek in Mondulakiri Province, bordering the provinces of Kratie to the west, Stung Treng to the northwest, Rattanakiri to the north, and the country of Vietnam to the east and south, and (ii) Veun Sai district in Rattanakiri province, located in the northeast of the country close to the Laos border. The study employed the standard WHO protocol for the surveillance of antimalarial therapeutic efficacy (23). The results of this study will be used to assist the Ministry of Health of Cambodia to inform the current national treatment guidelines for uncomplicated *P. falciparum* malaria and to update the policy if necessary.

TABLE 1 Patient baseline characteristics^a

Characteristic	Koh Gnek (N = 60)	Veun Sai (N = 61)
Female (n [%])	3 (5.0)	19 (31.1)
Age (yrs)	27.3 (10.8) (8.0–59.0)	21.6 (15.0) (7.0–64.0)
7–15 yrs (n [%])	1 (1.7)	24 (39.3)
>15 yrs (n [%])	59 (98.3)	37 (60.7)
Wt (kg)	54.9 (9.5) (21.0–84.0)	39.7 (12.5) (21.0–65.0)
Temp (°C)	38.5 (0.9) (37.5–40.5)	38.7 (0.4) (37.8–40.0)
Geometric mean parasitemia (/μl [range])	11,988 (904–107,635)	23,857 (1,114–385,575) ^b

^aAll values shown are means (standard deviations) (range) unless indicated otherwise. n, number of patients with the indicated characteristic; N, total number of patients evaluated.

^bQuality assurance of the slide reading conducted after the study reported that one patient had a parasitemia of >250,000 μl, but the patient was kept in the analysis as he cleared parasitemia at day 3 and remained negative until day 42.

RESULTS

Patient population. Sixty patients were recruited at Koh Gnek, and 61 were recruited at Veun Sai. One patient from each center was excluded from the per-protocol population; in both cases, the patient was lost to follow-up on day 1. Patient baseline characteristics are shown in Table 1. There was a lower proportion of children aged 7 to 15 years at Koh Gnek (1.1% [1/60]) versus Veun Sai (39.3% [24/61]). The geometric mean parasitemia was lower for Koh Gnek than for Veun Sai (Table 1).

Therapeutic efficacy. There were two late clinical failures at Koh Gnek, one of which was a recrudescence and one a *P. falciparum* reinfection, and two late clinical failures at Veun Sai, both recrudescences. Kaplan-Meier analysis reported cumulative probabilities of unadjusted ACPRs at day 42 of 96.6% (95% CI, 87.1 to 99.1) in Koh Gnek and 96.7% (95% CI, 87.3 to 99.2) in Veun Sai (Table 2).

The day 42 PCR-adjusted ACPRs in the per-protocol analysis were 98.3% ([57/58] 95% CI, 90.8 to 100.0) at Koh Gnek and 96.7% ([58/60] 95% CI, 88.5 to 99.6) at Veun Sai (Table 2). Using Kaplan-Meier analysis, the cumulative probability of PCR-adjusted ACPR at day 42 was 98.3% (95% CI, 88.4 to 99.8) in Koh Gnek and 96.7% (95% CI, 87.3 to 99.2) in Veun Sai (Fig. 1).

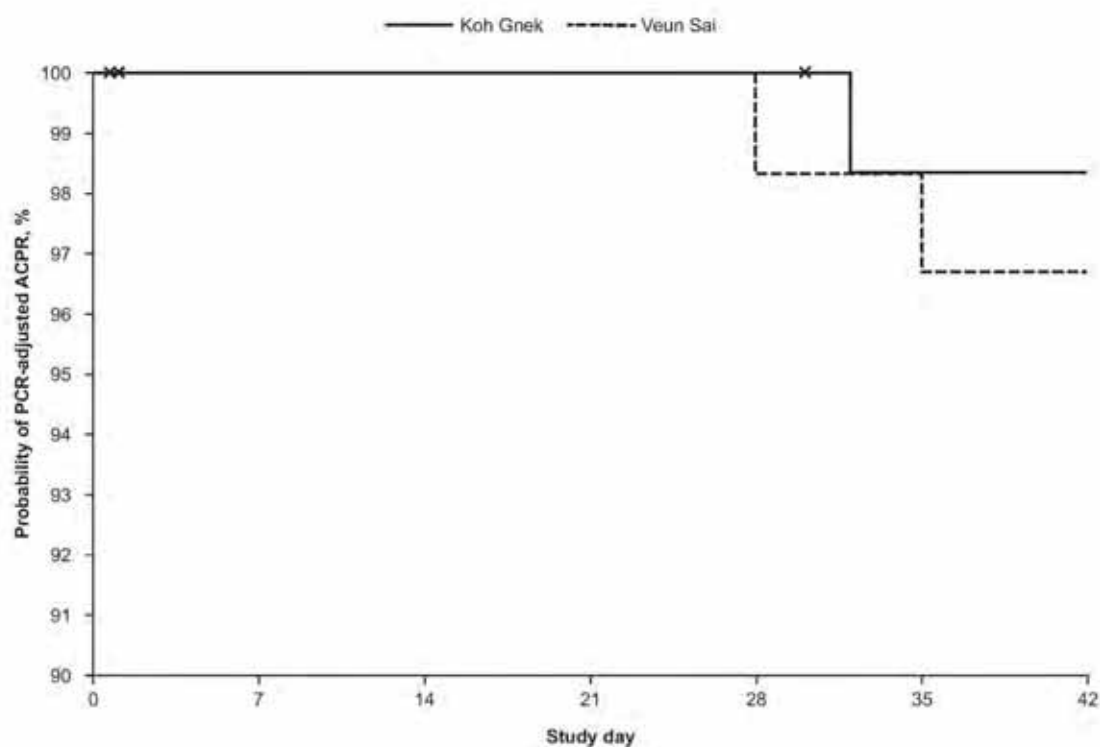
The proportions of patients with parasitemia on day 3 were 35.6% (21/59) for Koh Gnek and 46.7% (28/60) for Veun Sai, though all patients had parasite clearance by day 7 (Table 3). Of the four treatment failures, only one (Veun Sai) was parasite positive at day 3. However, all patients had parasite clearance by day 7, and four patients who still had parasites detected at day 4 had clearance by day 5, which was maintained until day 42.

Molecular markers. All of the three recrudescences occurring in this study had the molecular marker for artemisinin resistance (*K13* [C580Y]), and the two from Veun Sai also had increased *Pfpm2* copy numbers (three and four copies). The majority of isolates had at least one molecular marker of resistance to artemisinin, piperaquine, or mefloquine, though the prevalence of any marker was higher at Koh Gnek (87.7% [50/57]) compared to Veun Sai (67.9% [36/53]) (Fig. 2). Overall, *K13* was identified in 70.0% (77/110) of parasites isolated, with a higher prevalence in Koh Gnek versus Veun Sai; the

TABLE 2 Proportion of patients with day 42 ACPRs in the per-protocol population^a

Outcome	Koh Gnek		Veun Sai	
	n/N	% (95% CI)	n/N	% (95% CI)
Unadjusted ACPR	57/59	96.6 (88.3–99.6)	58/60	96.7 (88.5–99.6)
Total failures	2/59	3.4 (0.4–11.7)	2/60	3.3 (0.4–11.5)
PCR-adjusted ACPR	57/58	98.3 (90.8–100.0)	58/60	96.7 (88.5–99.6)
Total failures	1/58	1.7 (0.0–9.3)	2/60	3.3 (0.4–11.5)

^aAll failures were late clinical failures. One patient from each center was lost to follow-up and excluded from the per-protocol population. n/N, number of patients exhibiting the indicated result/total number of patients evaluated.



Number at risk

	0	7	14	21	28	35	42
Koh Gnek	60	59	59	59	59	57	57
Veun Sai	61	60	60	60	60	59	58

FIG 1 Primary efficacy outcome. The Kaplan-Meier probabilities of the PCR-adjusted adequate clinical and parasitological response (ACPR) following pyronaridine-artesunate treatment of *P. falciparum* malaria in eastern Cambodia were determined.

C580Y mutation was present in all cases with K13 mutations. An increased *Pfpm2* copy number was observed at both sites at high prevalence, though *Pfmdr1* amplification was observed only at Koh Gnek in isolates from two patients (Fig. 2). There were no parasites with both *Pfpm2* and *Pfmdr1* amplification. However, markers consistent with multidrug resistance were evident for artemisinin and piperazine at high prevalence, with K13 and *Pfpm2* concurrent in 47.4% (27/57) of the isolates from Koh Gnek and 60.4% (32/53) of the isolates from Veun Sai. Only one isolate (Koh Gnek) had concurrent K13/*Pfmdr1* markers.

In vitro drug susceptibility to pyronaridine. In 114 evaluable clinical isolates, the median pyronaridine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was 4.5 nM (interquartile range [IQR], 3.0 to 6.6) and the mean IC_{50} was 5.5 nM (standard deviation [SD], 3.5; range, 2.1 to 22.5). There was no relationship between outcome and pyronaridine IC_{50} (Fig. 3). Neither was there any relationship between molecular markers and the pyronaridine IC_{50} , except potentially for the single isolate with K13 and an increased

TABLE 3 Proportion of patients with parasitemia at each assessment^a

Assessment day	Koh Gnek		Veun Sai	
	N	n (%)	N	n (%)
0	60	0 (100.0)	61	61 (100.0)
1	60	54 (90.0)	61	56 (91.8)
2	59	41 (69.5)	61	45 (73.7)
3	59	21 (35.6)	61	29 (47.5)
7	59	0 (0.0)	61	0 (0.0)

^an, number of patients presenting with parasitemia; N, total number of patients evaluated.

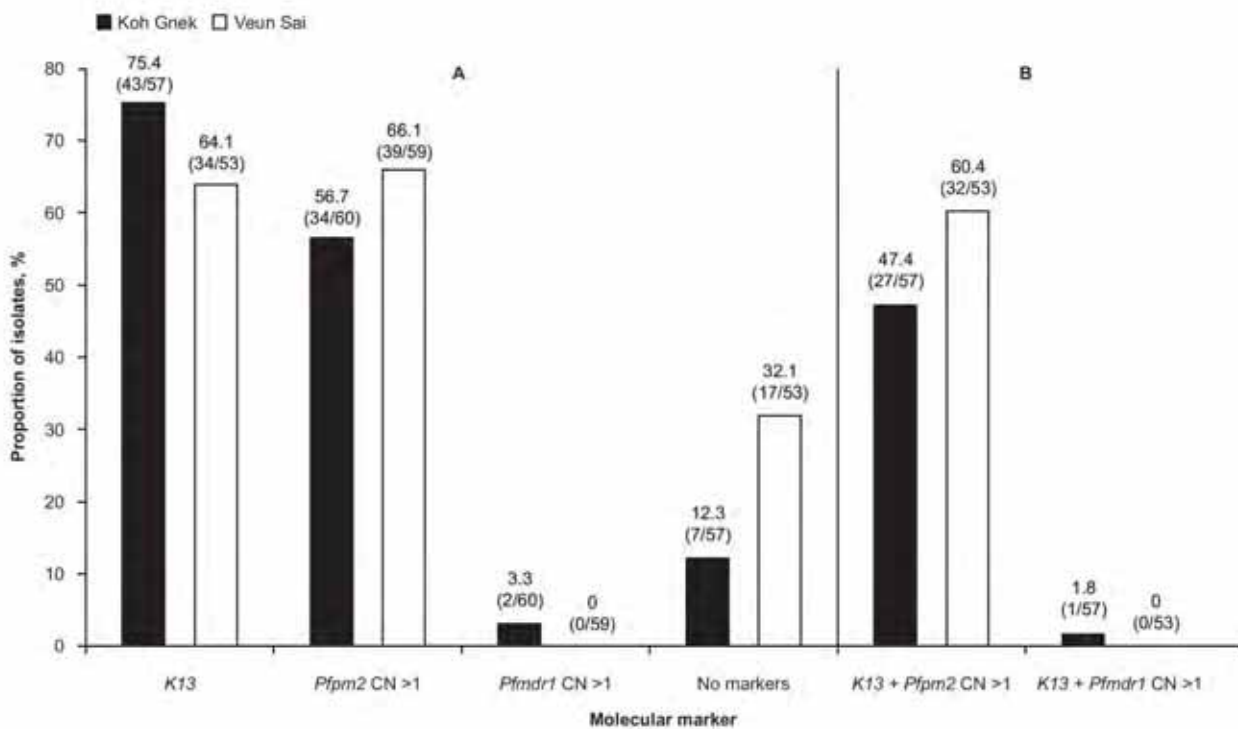


FIG 2 Molecular markers for antimalarial drug resistance. (A) Prevalence of mutations in genes associated with antimalarial drug resistance. (B) Prevalence of multidrug resistance. No isolates had both *Pfpm2* and *Pfmdr1* molecular markers. *K13*, *Kelch13* (C580Y); CN, copy number.

Pfmdr1 copy number, which had the highest IC_{50} value of 22.5 nM, although this patient had an ACPR with pyronaridine-artesunate at day 42 (Fig. 3).

Safety. Across the two study sites, adverse events of any cause occurred in 106 (87.6% [106/121]) of patients. The most frequent adverse events were headache and myalgia, which occurred from day 0 and were consistent with the symptoms of malaria (Table 4). There were no adverse events after day 3 and no serious or severe adverse events. There were no deaths during the study.

DISCUSSION

In this rural population in eastern Cambodia with *P. falciparum* malaria, pyronaridine-artesunate had high efficacy with day 42 PCR-adjusted ACPRs of 98.3% (95% CI, 88.4 to 99.8) in Koh Gnek and 96.7% (95% CI, 87.3 to 99.2) in Veun Sai. This was despite a high prevalence of the *K13* polymorphism associated with artemisinin resistance and an increased *Pfpm2* copy number, with the majority of the isolates being multidrug resistant. These results contrast with earlier studies in western Cambodia, which reported day 42 PCR-adjusted ACPRs of 87.9% (95% CI, 80.6 to 93.2%) overall, 89.8% (95% CI, 78.8 to 95.3%) for Pursat, and 84.0% (95% CI, 70.6 to 91.7%) for Pailin. The reasons for the difference in pyronaridine-artesunate efficacy between the two regions are unclear. However, treating malaria in the border regions of western Cambodia with ACTs is challenging, and it is possible that additional unknown drug resistance mechanisms are contributing to antimalarial drug failures in the region.

In the present study, there were only three cases with recrudescence, two of which had *K13* and an increased *Pfpm2* copy number. However, there was no relationship between pyronaridine IC_{50} and outcome, and the failures do not appear to be associated with pyronaridine resistance. It is possible that the three recrudescence cases may have been caused by inadequate drug exposure. However, pharmacokinetic data were not collected in this study, and these findings require further investigation.

There are currently no validated molecular markers for pyronaridine resistance or a validated pyronaridine IC_{50} breakpoint that predicts clinical failure. The median pyronaridine IC_{50} reported here (4.6 nM [IQR, 3.0 to 6.6]) was lower than reported from the

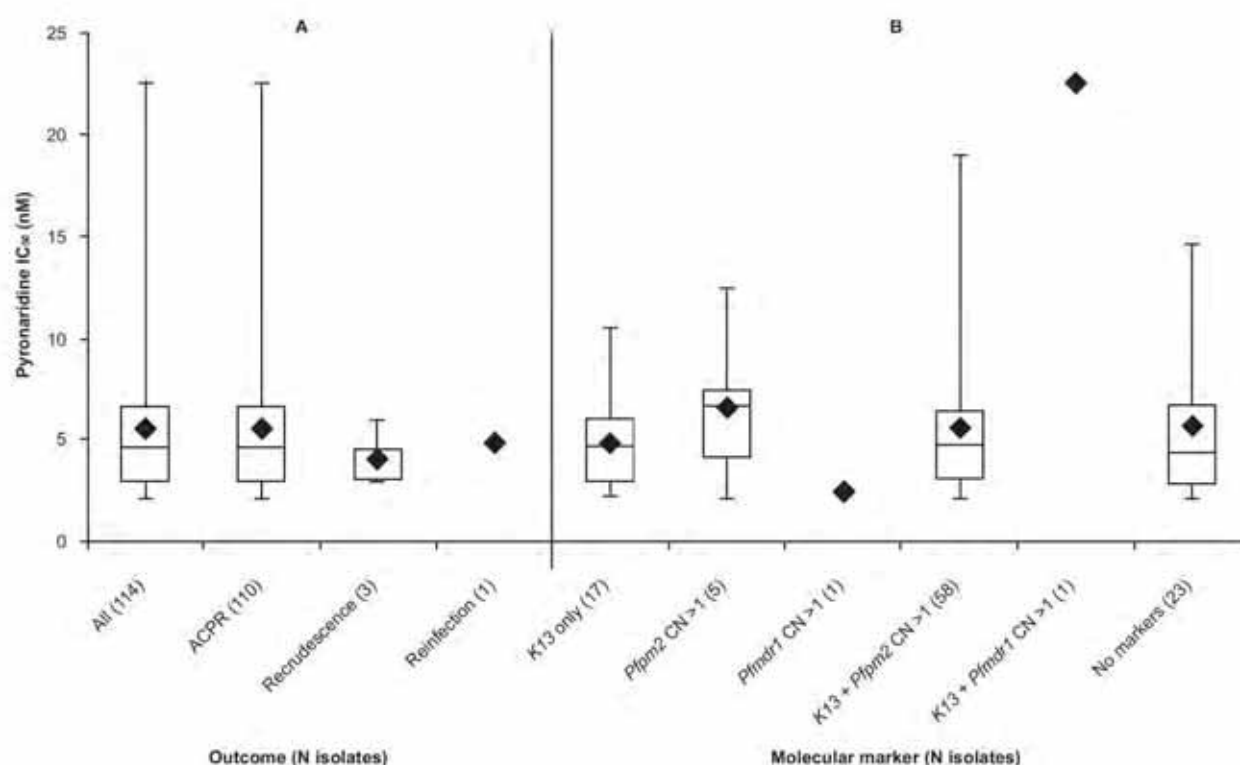


FIG 3 Pyronaridine *in vitro* activity. Pyronaridine IC_{50} values against *P. falciparum* clinical isolates and relationship to efficacy outcomes (A) and molecular markers (B) of resistance to artemisinin, piperazine, and mefloquine. Boxes show medians \pm the interquartile ranges; closed diamonds are means, and whiskers indicate maximum and minimum values. Note that only isolates that had both pyronaridine IC_{50} values and molecular marker data are included in this analysis. CN, copy number.

China-Myanmar border in 107 *P. falciparum* field isolates collected between from 2007 and 2012 (10.3 nM [6.6 to 17.3]) and 62 isolates collected in 2008 (9.8 nM [6.8 to 15.5]) (24, 25), whereas in 118 Thai *P. falciparum* isolates the mean pyronaridine IC_{50} was 5.6 ± 3.1 nM (range, 0.2 to 15.4 nM), similar to that reported here (5.5 ± 3.5 nM; range, 2.1 to 22.5) (26). These indications are particularly promising in line with the history of *P. falciparum* chemoresistance in Cambodia to a large panel of antimalarial drugs. In addition, the slight regional variations in *P. falciparum* susceptibility to pyronaridine reinforces the importance of considering pyronaridine-artesunate for malaria treatment elsewhere in South-East Asia.

Although adverse events were frequent in this single-arm study, they were consistent with the symptoms of malaria, and there were no serious adverse events. Previous large comparative studies have reported an adverse event profile for pyronaridine-artesunate that was similar to that of artemether-lumefantrine and mefloquine-artesunate in *falciparum* malaria (14, 16–18, 20, 27, 28). In these studies, transient elevations in alanine aminotransferase were more common with pyronaridine-

TABLE 4 Frequency of adverse events^a

Adverse event	Frequency (n [%]) (N = 121)
Any adverse event	106 (87.6)
Any serious adverse event	0 (0.0)
Headache	115 (95.0)
Myalgia	89 (71.1)
Dizziness	83 (68.6)
Fatigue	82 (67.8)
Insomnia	78 (64.5)
Nausea	17 (14.1)
Vomiting	8 (6.6)

^an, number of patients presenting an adverse effect; N, total number of patients evaluated.

artesunate versus comparators, but normalized by day 28, and did not lead to any clinical sequelae (28).

A single dose of primaquine (15 mg) was included in the treatment protocol, in line with Cambodia national prescribing guidelines. This is a promising approach for reducing gametocyte carriage and hence onward transmission from humans to mosquitoes. Primaquine causes hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient individuals (29). This study was limited in that hematological measurements were not done, and G6PD levels were not assessed. However, the single-dose 15-mg primaquine regimen has been extensively reviewed and is considered safe in G6PD-deficient individuals, with no requirement for prior G6PD testing (30). Since primaquine has no activity against falciparum asexual stages (31), its use in this protocol would not have affected the efficacy results obtained for pyronaridine-artesunate. The impact of primaquine on gametocyte carriage was not evaluated in this study.

It is essential that malaria eradication is achieved in Cambodia and the Greater Mekong subregion. However, artemisinin resistance is widespread in the parasite population, even in eastern Cambodia, extending parasite clearance times and exposing the partner drug to higher parasite loads. Thus, once resistance to the partner drug emerges, it can be readily selected and rapidly propagates. Where possible, ACT diversification is likely to expand the life span of the available therapies by reducing drug pressure from a unique class of molecule. In a previous study of pyronaridine-artesunate efficacy conducted in western Cambodia, efficacy was below the WHO-recommended threshold at day 42 for medicines with a long half-life (90%) for first-line treatment of *P. falciparum* malaria (22). However, in eastern Cambodia, pyronaridine-artesunate efficacy exceeded this criterion, and this ACT should be considered for antimalarial diversification in the region.

MATERIALS AND METHODS

Study design and participants. This was a single-arm, open label, prospective evaluation of clinical and parasitological responses to directly observed treatment with pyronaridine-artesunate for uncomplicated *P. falciparum* malaria. Subjects were recruited between July and December 2017 from two health centers in eastern Cambodia: Koh Gnek in Mondulkiri Province and Veun Sai in Rattanakiri province. Ethical approval was provided by the National Ethics Committee at the Institute of Public Health, Cambodia and the WPRO Ethical Review Committee. The study is registered in the Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR; reference ACTRN12618001300268).

Mondulkiri is the most sparsely populated province in Cambodia, despite being the largest in land area. The population of 8,919 is rural and mostly involved in subsistence agriculture. Low-level malaria transmission occurs throughout the year but with peaks during the rainy season (June to November). The district of Veun Sai in Rattanakiri province has a population of 15,130 which includes 34 villages serviced by two health centers (Veun Sai and Kachone). Most of the population are ethnic minorities, and the main occupations are farming, fishing, and logging. Malaria is seasonal with a moderate and unstable transmission pattern and occurs in all age groups. The Veun Sai health center provides health care mostly to the patients in 22 villages and other patients referred from Kachone health center for the study.

The study population included patients with uncomplicated malaria aged 7 years and above, weighing at least 20 kg, with microscopically confirmed *P. falciparum* mono-infection between 500 and 250,000 parasites/ μ l and fever or history of fever in the previous 24 h. Children under 7 years were excluded because the health centers could not provide appropriate facilities for this age group. Unmarried females aged 12 to 18 years were also excluded, since asking for their participation would not be accepted culturally, given the need for a pregnancy test. Further reasons for exclusion were the presence of severe malaria, signs of severe malnutrition, the presence of febrile conditions other than malaria or other known underlying chronic or severe diseases, the need for medication that would interfere with antimalarial pharmacokinetics, and a history of hypersensitivity reactions or contraindications to the study medicine (i.e., patients with signs of hepatic impairment or known significant liver function test abnormalities, severe renal impairment) and for women of child-bearing potential, with a positive pregnancy test, breastfeeding, or refusing to take a pregnancy test or use contraception for the duration of the study. All adult patients and the parents or guardians of children <18 years provided written informed consent. Children aged 12 to 18 years also provided written assent. The full study protocol is available online with this article.

Procedures. Patients were treated as in-patients on days 0 to 3 with follow-up visits as outpatients on days 7, 14, 21, 28, 35, and 42. A complete medical history was taken, the axillary temperature was measured, and a standard physical examination was performed at baseline (day 0 before dosing); on days 1, 2, and 3; and at all follow-up visits.

Pyronaridine-artesunate (Pyramax; Shin Poong Pharmaceutical Co., Ansan, South Korea) was given orally with water once daily for 3 days (days 0 to 2) and dosed according to body weight as follows: 20 to <24 kg, one tablet; 24 to <45 kg, two tablets; 45 to <65 kg, three tablets; \geq 65 kg, four tablets. One

tablet of pyronaridine-artesunate contains 60 mg artesunate plus 180 mg pyronaridine. On day 0, patients also received a single 0.25-mg/kg (15-mg oral adult dose) dose of primaquine (Sanofi Canada, Laval, Canada). All treatments were supervised. If vomiting occurred within 30 min of dosing, the treatment was repeated, and if the patient vomited again within 30 min, they were withdrawn and treated with rescue medication. Ancillary treatment, such as antipyretics, was provided as necessary. Recurrent infections were treated with rescue medication according to local clinical guidelines. Any patient with severe malaria received parenteral therapy with artemether or quinine for 7 days plus tetracycline for 7 days, as well as relevant supportive treatments.

Parasite assessments were conducted according to WHO guidelines (23). Duplicate thick blood films and one thin blood film were examined at screening on day 0 and on days 1, 2, and 3 or until two consecutive negative slides on two consecutive days were obtained. Parasitemia was also evaluated on days 7, 14, 21, 28, 35, and 42 or on any other day if clinically indicated. Giemsa-stained thick blood smears were examined independently by two microscopists, and the average of the two counts was recorded. Blood smears with discordant results were reexamined by a third independent microscopist, and the parasite density was calculated by averaging the two closest counts. Parasite density was expressed as the number of asexual parasites per μl of blood, calculated by dividing the number of asexual parasites by the number of white blood cells counted (at least 200 required) and then multiplying that number by an assumed white blood cell density (6,000 per μl). A blood slide was considered negative when examination of 1,000 white blood cells or 100 fields containing at least 10 white blood cells per field revealed no asexual parasites.

In vitro drug susceptibility testing for pyronaridine was conducted by the Institut Pasteur in Cambodia using blood samples collected on day 0 using the standard microtest, whereby parasites are cultivated for 48 h in the presence of [^3H]hypoxanthine and different concentrations of antimalarial drugs (23). The results are expressed as the drug concentration that inhibits parasite growth by 50% (IC_{50}).

PCR genotyping was conducted at the Institut Pasteur in Cambodia, using established methods (32). Finger-prick blood samples were collected on filter paper (Whatman 3MM; GE Healthcare, Pittsburgh, PA) both at screening and whenever samples for parasite assessment were taken on or after day 7. Recrudescence was defined as at least one matching allelic band for *P. falciparum* marker genes (*msp1*, *msp2*, and *glurp*) between baseline samples and samples from post-day 7 recurrences. To further investigate molecular markers of resistance to artemisinin, piperazine, and mefloquine, the *Kelch13* (*K13*) gene was sequenced, and gene copy numbers for *Pfpm2* (*P. falciparum* plasmepsin 2) and *Pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1) were determined at the Institut Pasteur in Cambodia using published methods (13, 33).

Outcomes. Treatment outcomes were classified on the basis of an assessment of the parasitological and clinical outcome of antimalarial treatment according to the latest WHO guidelines (23). The primary outcome measure was a PCR-corrected adequate clinical and parasitological response (ACPR) at day 42, defined as the absence of parasitemia, irrespective of axillary temperature, in patients who did not previously meet any of the criteria of early treatment failure, late clinical failure, or late parasitological failure (23).

Adverse events were documented, with all patients asked routinely about previous symptoms and about symptoms that had emerged since the previous follow-up visit. Exploratory outcomes were the *in vitro* susceptibility of *P. falciparum* isolates to pyronaridine at day 0 and the analysis of molecular markers.

Statistical analysis. The primary outcome was evaluated by using Kaplan-Meier analysis and also by evaluating the proportion of patients with the outcome in a per-protocol analysis.

In the Kaplan-Meier analysis, patients who withdrew from the study, who were lost to follow-up, or who had non-falciparum *Plasmodium* infections were censored on the last day of follow-up. In addition, for the PCR-corrected results, reinfections were censored on the day of reinfection, and those with missing or undetermined PCR results were excluded.

In the per-protocol analysis, patients who withdrew from the study, who were lost to follow-up, or who had non-falciparum *Plasmodium* infection were excluded, as were patients with reinfections and missing/undetermined PCR results.

Kaplan-Meier estimates were compared using a log-rank test ($P < 0.05$ was considered significant), and 95% CI values were calculated. Statistical analysis used the WHO reporting system based on Excel (version 2010; Microsoft, Inc., Seattle, WA).

Based on previous data from western Cambodia indicating a treatment failure rate of 10% for pyronaridine-artesunate, at a confidence level of 95% and a precision around the estimate of 8%, a minimum of 54 patients was needed. To allow for loss to follow-up and withdrawals, target recruitment was 60 patients per site. Data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Bill & Melinda Gates Foundation through the World Health Organization. The funding source was not involved in the design and conduct of the study, the interpretation of the results, or the development of this publication. Naomi Richardson of Magenta Communications, Ltd., developed a first draft of this article from the statistical output, collated author contributions, and provided graphic services and was funded by the WHO. Pyronaridine-artesunate was donated by Shin Poon Pharmaceutical Co., Seoul, Republic of Korea. We acknowledge the contri-

butions of the local health staffs of the Koh Gnek Health Center, Mondulkiri province, and the Veun Sai Health Center, Rattanakiri province.

R.L., H.C., and R.H. designed the study. M.D.B. and D.M.B. entered the data and validated microscopy. R.L., B.W., M.D.B., and P.R. analyzed and interpreted the data. M.M.-K., N.K., and B.W. conducted the laboratory work (*in vitro* test, *P. falciparum* PCR, and analysis of molecular markers). All authors critically reviewed the paper and approved the final version of the paper for submission.

D.M.B., M.D.B., and P.R. are staff members of the WHO. The authors alone are responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the decisions, policy, or views of the World Health Organization.

There are no conflicts of interest to report.

REFERENCES

- Kingdom of Cambodia Ministry of Health. 2016. Cambodia malaria elimination action framework 2016–2020. Kingdom of Cambodia Ministry of Health, Phnom Penh, Cambodia. <http://www.malariaeradication.org/knowledge-hub/cambodia-malaria-elimination-action-framework-2016-2020>.
- World Health Organization. 2015. Strategy for malaria elimination in the Greater Mekong Subregion (2015–2030). World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/10945/9789290617181_eng.pdf?sequence=1.
- Noeld H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, Artemisinin R. 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359:2619–2620. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0805011>.
- Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Tan JC, Al Saai S, Phyto AP, Moo CL, Lwin KM, McGready R, Ashley E, Imwong M, Stepniewska K, Yi P, Dondorp AM, Mayxay M, Newton PN, White NJ, Nosten F, Ferdig MT, Anderson TJ. 2012. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science* 336:79–82. <https://doi.org/10.1126/science.1215966>.
- Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AVO, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S, Nosten F, Su X-Z, Ringwald P, Arie F, Djimeck C, Hien TT, Boni MF, Thai CQ, Amambua-Ngwa A, Conway DJ, Djimdé AA, Doumbo OK, Zongo I, Ouedraogo J-B, Alcock D, Drury E, Auburn S, Koch O, Sanders M, Hubbard C, Maslen G, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Miles A, O'Brien J, Gamble C, Oyola SO, Rayner JC, Newbold CI, Berriman M, Spencer CCA, McVean G, Day NP, White NJ, Bethell D, Dondorp AM, Plowe CV, Fairhurst RM, Kwiatkowski DP. 2013. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet* 45:648–655. <https://doi.org/10.1038/ng.2624>.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361:455–467. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859>.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, Incardona S, Lim P, Sem R, Socheat D, Christophel EM, Ringwald P. 2006. Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health* 11: 1360–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01690.x>.
- Lim P, Chim P, Sem R, Nemh S, Poravuth Y, Lim C, Seila S, Tsuyuoka R, Denis MB, Socheat D, Fandeur T. 2005. *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* susceptibility to artesunate, mefloquine, quinine, and chloroquine in Cambodia: 2001–2002. *Acta Trop* 93:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.002>.
- Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfdm1* gene copy number. *Lancet* 364:438–447. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16767-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16767-6).
- Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfdm1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1143–1147. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1143>.
- Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B, Duru V, Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D. 2015. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4719–4726. <https://doi.org/10.1128/AAC.00835-15>.
- Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, Sam B, Dek D, Try V, Amato R, Blessborn D, Song L, Tullo GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM. 2016. Dihydroartemisinin-piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 16:357–365. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00487-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00487-9).
- Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale J-C, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Pujalon O, Arie F, Ménard D. 2017. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:174–183. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30415-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30415-7).
- West African Network for Clinical Trials of Antimalarial Drugs. 2018. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperazine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet* 391:1378–1390. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30291-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30291-5).
- Roth JM, Sawa P, Makio N, Omweri G, Osoti V, Okach S, Choy F, Schallig H, Mens P. 2018. Pyronaridine-artesunate and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kenyan children: a randomized controlled non-inferiority trial. *Malar J* 17:199. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2340-3>.
- Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, Camara D, Somé AF, Coulibaly AS, Traore OB, Dara N, Kabore MJT, Thera I, Compaore YD, Sylla MM, Nikiema F, Diallo MS, Dicko A, Gil JP, Bormann S, Duparc S, Miller RM, Doumbo OK, Shin J, Bjorkman A, Ouedraogo J-B, Sirima SB, Djimdé AA. 2016. Safety and efficacy of re-treatments with pyronaridine-artesunate in African patients with malaria: a substudy of the WANECAM randomised trial. *Lancet Infect Dis* 16:189–198. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00318-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00318-7).
- Rueangweerayut R, Phyto AP, Uthaisin C, Poravuth Y, Binh TQ, Tinto H, Penali LK, Valecha N, Tien NT, Abdulla S, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L, Pyronaridine-Artesunate Study Team. 2012. Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *N Engl J Med* 366:1298–1309. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007125>.
- Kayentao K, Doumbo OK, Penali LK, Offianan AT, Bhatt KM, Kimani J, Tshetu AK, Kokolomami JH, Ramharther M, de Salazar PM, Tiono AB, Ouedraogo A, Bustos MD, Quicho F, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L. 2012. Pyronaridine-artesunate granules versus artemether-lumefantrine crushed tablets in children with *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized controlled trial. *Malar J* 11:364. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-364>.
- Kurth F, Belard S, Basra A, Ramharther M. 2011. Pyronaridine-artesunate

- combination therapy for the treatment of malaria. *Curr Opin Infect Dis* 24:564–569. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834cabdb>.
20. Tshetu AK, Gaye O, Kayentao K, Thompson R, Bhatt KM, Sesay SS, Bustos DG, Tjitra E, Bedu-Addo G, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L. Pyronaridine-Artesunate ST. 2010. Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in children and adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 375:1457–1467. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60322-4).
 21. Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp I, Belard S, Schlie M, Kammer J, Koumba PK, Cisse B, Mordmuller B, Lell B, Issifou S, Oouvray C, Fleckenstein L, Kremsner PG. 2008. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon. *J Infect Dis* 198:911–919. <https://doi.org/10.1086/591096>.
 22. Leang R, Canavati SE, Khim N, Vestergaard LS, Borghini Fuhrer I, Kim S, Denis MB, Heng P, Tol B, Huy R, Duparc S, Dondorp AM, Menard D, Ringwald P. 2016. Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3884–3890. <https://doi.org/10.1128/AAC.00039-16>.
 23. World Health Organization. 2009. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241597531/en/>.
 24. Bai Y, Zhang J, Geng J, Xu S, Deng S, Zeng W, Wang Z, Ngassa Mbenda HG, Zhang J, Li N, Wu Y, Li C, Liu H, Ruan Y, Cao Y, Yang Z, Cui L. 2018. Longitudinal surveillance of drug resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from the China-Myanmar border reveals persistent circulation of multidrug-resistant parasites. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8:320–328. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.05.003>.
 25. Zeng W, Bai Y, Wang M, Wang Z, Deng S, Ruan Y, Feng S, Yang Z, Cui L. 2017. Significant divergence in sensitivity to antimalarial drugs between neighboring *Plasmodium falciparum* populations along the eastern border of Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01689-16.
 26. Mahotom K, Tan-Ariya P, Thita T, Ruang-Areerate T, Sittichot N, Suwandittakul N, Mungthin M. 2018. *In vitro* sensitivity of pyronaridine in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 98:51–56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0286>.
 27. Poravuth Y, Socheat D, Rueangweerayut R, Uthaisin C, Pyae Phyo A, Valecha N, Rao BH, Tjitra E, Purnama A, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L. 2011. Pyronaridine-artesunate versus chloroquine in patients with acute *Plasmodium vivax* malaria: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. *PLoS One* 6:e14501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014501>.
 28. Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Craft CJ, Arbe-Barnes S, Miller RM, Shin CS, Fleckenstein L. 2013. Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malar J* 12:70. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-70>.
 29. Beutler E. 1959. The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. *Blood* 14:103–139.
 30. World Health Organization. 2015. Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocide in *Plasmodium falciparum* malaria. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-single-dose-primaquine-pf/en/>.
 31. Cabrera M, Cui L. 2015. *In vitro* activities of primaquine-schizonticide combinations on asexual blood stages and gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7650–7656. <https://doi.org/10.1128/AAC.01948-15>.
 32. World Health Organization. 2008. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596305/en/>.
 33. Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale J-C, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505:50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>.

1 **Pyronaridine-artesunate plus single-dose primaquine efficacy and safety for**
2 **the treatment of malaria in western Cambodia**

3
4 Rithea Leang,^a# Nimol Khim,^b Huch Chea,^a Rekol Huy,^a Melissa Mairret-Khedim,^b Denis Mey Bouth,^c
5 Maria Dorina Bustos,^d Pascal Ringwald,^e Benoit Witkowski^b

6
7 ^aNational Center for Parasitology, Entomology & Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia.

8 ^bInstitut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia.

9 ^cWorld Health Organization, Phnom Penh, Cambodia.

10 ^dWorld Health Organization, Bangkok, Thailand.

11 ^eWorld Health Organization, Geneva, Switzerland.

12
13 Running head: Pyronaridine-artesunate efficacy in Cambodia

14 Word count: 958

15
16 #Address correspondence to:

17 Rithea Leang, rithealeang@gmail.com

18 National Center for Parasitology, Entomology & Malaria Control

19 Corner St. 92, Tropeang Svay, Phnom Penh Thmey, Khan Sen Sok

20 Phnom Penh, Cambodia

21
22 Keywords: Pyronaridine-artesunate, artemisinin, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*,

23 Cambodia, drug resistance

24
25

26 **Abstract**

27 This single-arm trial (N=104) in western Cambodia, showed high efficacy for 3-day pyronaridine-
28 artesunate plus single-dose primaquine in *Plasmodium falciparum* malaria: day-42 PCR-adjusted
29 adequate clinical and parasitological response (ACPR) was 98.3% ([58/59] 95%CI 90.9–100.0) in
30 Trapeng Chau (Kampong Speu), and 100% ([41/41] 95%CI 91.4–100) in Veal Veng (Pursat); 80.6%
31 (83/103) had drug resistance molecular markers. For *P. vivax*, pyronaridine-artesunate day-28 ACPR
32 was 98.3% (59/60; 95%CI 91.1–100) and 100% (60/60; 95%CI 94.0–100), respectively.

33

34

35 Short Report

36 Multi-drug-resistant *Plasmodium falciparum* are highly prevalent in western Cambodia, and
37 therapeutic options for the treatment of uncomplicated malaria are increasingly limited (1-5). New
38 therapeutic options are needed to support malaria elimination in the region (6). Pyronaridine-
39 artesunate is an artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated *P.*
40 *falciparum* and *P. vivax* malaria. Previous studies with pyronaridine-artesunate in *P. falciparum*
41 malaria indicated >95% efficacy in eastern Cambodia (7), though in western Cambodia (Pursat/Pailin)
42 efficacy was lower (87.2% [95%CI 79.7 to 92.6]) (8). The current study evaluated the efficacy and
43 safety of pyronaridine-artesunate plus single-dose primaquine in uncomplicated *P. falciparum*
44 malaria in two areas of known *P. falciparum* multi-drug resistance in western Cambodia. This study
45 follows the same methodology as a previous study in eastern Cambodia (7), except that
46 pyronaridine-artesunate efficacy and safety in *P. vivax* malaria was also investigated.

47

48 Patients with microscopically confirmed malaria were recruited between September and December
49 2018 from health centers in western Cambodia: Trapeng Chau (Kampong Speu) and Veal Veng
50 (Pursat). Eligible subjects were ≥ 7 years' old and bodyweight ≥ 20 kg with fever/history of fever, *P.*
51 *falciparum* or *P. vivax* mono-infection (500–250,000 sexual parasites μL^{-1}). Exclusion criteria were:
52 pregnancy, severe or complicated malaria, malnutrition, concomitant disease, known kidney and
53 hepatic disease, hypersensitivity, or contraindication to the study drugs. All patients or their
54 guardians provided written informed consent plus assent if under 18 years of age. Ethical approval
55 was granted by the National Ethic Committee at the National Institute of Public Health, Phnom Penh,
56 and the Ethics Review Committee of the WHO Regional Office for the Western Pacific. The study is
57 registered in the Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR), reference:
58 ACTRN12618001999224.

59

60 The study was conducted using the standard World Health Organization protocol for the assessment
61 of antimalarial efficacy (9). Study procedures, evaluations and analysis were consistent with a
62 previously reported study conducted in eastern Cambodia (7). Patients received oral pyronaridine-
63 artesunate (Shin Poong Pharmaceutical Co., Ansan Korea) once-daily for three days, dosed according
64 to bodyweight, plus single-dose primaquine 15 mg on day 0 for falciparum cases (7, 10). The primary
65 outcome was adequate clinical and parasitological response (ACPR), defined as no parasitemia
66 without previous treatment failure (9). The primary outcome was evaluated for *P. falciparum* at day
67 42, and for *P. vivax* at day 28. For *P. falciparum*, ACPR was adjusted for re-infection using polymerase
68 chain reaction (PCR) genotyping using published methods (11). Data were analyzed using a WHO
69 Excel spreadsheet. To determine the prevalence of *P. falciparum* molecular markers to artemisinin,
70 piperaquine and mefloquine, the *Kelch13* (*K13*) gene was sequenced, and gene copy number for
71 *plasmepsin 2* (*Pfpm2*) and *multidrug resistance 1* (*Pfmdr1*) were determined, using published
72 methods (12, 13). The threshold for genic amplification was defined as >1.5 copies.

73
74 The study population included 104 patients with *P. falciparum* and 120 with *P. vivax* malaria;
75 baseline data were similar across the two sites, though *P. falciparum* parasitemia was higher in
76 Trapeng Chau (Table 1). For *P. falciparum*, day-42 PCR-adjusted ACPR was 98.3% (95%CI 88.8–99.8)
77 in Trapeng Chau and 100% in Veal Veng (Kaplan–Meier). In a per-protocol analysis, the proportion of
78 patients with day-42 PCR-adjusted ACPR was 98.3% ([58/59] 95%CI 90.9–100.0) in Trapeng Chau and
79 100% ([41/41] 95%CI 91.4–100) in Veal Veng.

80
81 Previous data from Pursat indicated a day-42 ACPR (Kaplan–Meier) of 89.8% (95% CI, 78.8 to 95.3%)
82 (8). Efficacy in the current study was higher in Veal Veng (Pursat) (100%), but this difference was not
83 statistically significant ($p=0.4$). The single recrudescence at Trapeng Chau occurred in a 7-year-old
84 child at day 35 consecutively with an infection by an artemisinin- and piperaquine-resistant strain
85 (*K13* C580Y, *Pfpm2* amplification). Only two patients had *P. falciparum* gametocytes at day 0 (both

86 from Trapeng Chau), which is an unusually low baseline gametocyte prevalence (1.9% [2/104]), rates
87 of around 10% being previously reported from Cambodia (14, 15). However, stringent quality control
88 for microscopy at these experienced sentinel sites supports these findings. No further gametocytes
89 were detected throughout the study in any patient, indicating the high efficacy of primaquine to
90 suppress transmission.

91

92 Day-3 parasite positivity rate was 41.7% (25/60; 95%CI 29.1–55.1) in Trapeng Chau and 28.6%
93 (12/42; 95%CI 15.7–44.6) in Veal Veng. This is consistent with a higher prevalence of *K13* molecular
94 markers associated with artemisinin resistance in Trapeng Chau (85.2%; 52/61) versus Veal Veng
95 (54.8%; 23/42) (Figure 1). The prevalence of multi-resistant strains, with both *K13* mutations and
96 either *Pfpm2* and/or *Pfmdr1* copy number amplification was similar in Trapeng Chau (44.3% [27/61])
97 and Veal Veng (40.5% [17/42]) (Figure 1). A triple mutant, with molecular markers associated with
98 artemisinin, piperaquine and mefloquine resistance, was identified at Trapeng Chau, as has
99 previously been noted in northeastern Cambodia (Preah Vihear province) (16).

100

101 For *P. vivax*, day-28 ACPR was 98.3% (59/60; 95%CI 91.1, 100) in Trapeng Chau and 100% (60/60;
102 95%CI 94.0, 100) in Veal Veng. Day-3 parasite positivity rate was 0% (0/60) in patients from Trapeng
103 Chau and 1.7% (1/60) in Veal Veng.

104

105 Adverse events were consistent with the symptoms of malaria and generally declined in frequency
106 during treatment (Table 2). Notably, there were no cases of dark urine in falciparum cases,
107 consistent with recent data indicating the safety of single-dose primaquine administration (17).

108 There were no serious adverse events or deaths.

109

110 Pyronaridine-artesunate had >98% efficacy in these two sentinel sites in western Cambodia in both
111 *P. falciparum* and *P. vivax* malaria with no adverse events of concern. This is in the context of a high

112 prevalence of molecular markers for artemisinin resistance (72.8% [75/103]) in *P. falciparum*, which
113 was associated with markers for piperaquine and/or mefloquine resistance in 42.7% (44/103) of
114 isolates. Pyronaridine-artesunate is a suitable option for the treatment of malaria in Kampong Speu
115 and Pursat, with continuing efficacy surveillance at these sentinel sites.
116

117 **Funding**

118 This work was supported by the Bill & Melinda Gates Foundation and USAID-PMI through the World
119 Health Organization. The funding source was not involved in the design and conduct of the study,
120 the interpretation of the results and the development of this publication.

121

122 **Contributions**

123 RL, CH and HR designed the study. DMB and MDB entered the data and validated microscopy. RL
124 BW, MDB and PR analyzed and interpreted the data. MMK, NK and BW conducted the laboratory
125 work (therapeutic efficacy, PCR adjustment, and analysis of molecular markers). All authors critically
126 reviewed the paper and approved the final version of the paper for submission.

127

128 **Disclaimer**

129 DMB, MDB and PR are staff members of the World Health Organization. The authors alone are
130 responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the
131 decisions, policy or views of the World Health Organization.

132

133 **Declaration of interests**

134 There are no conflicts of interest to report.

135

136 **Acknowledgments**

137 This study was supported by the Bill & Melinda Gates Foundation through the World Health
138 Organization. The funding source was not involved in the design and conduct of the study, the
139 interpretation of the results and the development of this publication. Naomi Richardson of Magenta
140 Communications Ltd developed a first draft of this article from the statistical output, collated author
141 contributions and provided graphic services and was funded by the World Health Organization. The
142 authors would like to acknowledge the contributions of the local health staff.

143 **References**

- 144 1. **Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B, Duru V,**
145 **Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D.** 2015. Evidence of *Plasmodium falciparum*
146 malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia:
147 Dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob*
148 *Agents Chemother* 59:4719-4726.
- 149 2. **Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, Sam B, Dek D, Try V, Amato R,**
150 **Blessborn D, Song L, Tullo GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM.** 2016.
151 Dihydroartemisinin-piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a
152 multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 16:357-365.
- 153 3. **Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, Incardona S, Lim P, Sem R,**
154 **Socheat D, Christophel EM, Ringwald P.** 2006. Surveillance of the efficacy of artesunate and
155 mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in
156 Cambodia. *Trop Med Int Health* 11:1360-1366.
- 157 4. **Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga**
158 **C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y,**
159 **Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S,**
160 **Nosten F, Su XZ, Ringwald P, Arie F, Dolecek C, Hien TT, Boni MF, Thai CQ, Amambua-**
161 **Ngwa A, Conway DJ, Djimde AA, Doumbo OK, Zongo I, Ouedraogo JB, Alcock D, Drury E,**
162 **Auburn S, Koch O, Sanders M, Hubbard C, Maslen G, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Miles A,**
163 **O'Brien J, Gamble C, Oyola SO, et al.** 2013. Multiple populations of artemisinin-resistant
164 *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet* 45:648-655.
- 165 5. **Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, Artemisinin Resistance in**
166 **Cambodia 1 Study C.** 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia.
167 *N Engl J Med* 359:2619-2620.

- 168 6. **World Health Organization.** 2015. Strategy for malaria elimination in the Greater Mekong
169 Subregion (2015-2030). World Health Organization, Geneva.
170 [http://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/10945/9789290617181_eng.pdf;jsessio](http://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/10945/9789290617181_eng.pdf;jsessionid=3204C3285C2E6290730A3453BFFD279D?sequence=1)
171 [nid=3204C3285C2E6290730A3453BFFD279D?sequence=1](http://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/10945/9789290617181_eng.pdf;jsessionid=3204C3285C2E6290730A3453BFFD279D?sequence=1). Accessed 3rd June 2019.
- 172 7. **Leang R, Mairet-Khedim M, Chea H, Huy R, Khim N, Mey Bouth D, Dorina Bustos M,**
173 **Ringwald P, Witkowski B.** 2019. Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate plus single-
174 dose primaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in
175 eastern Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.02242-18.
- 176 8. **Leang R, Canavati SE, Khim N, Vestergaard LS, Borghini Fuhrer I, Kim S, Denis MB, Heng P,**
177 **Tol B, Huy R, Duparc S, Dondorp AM, Menard D, Ringwald P.** 2016. Efficacy and safety of
178 pyronaridine-artesunate for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in
179 western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3884-3890.
- 180 9. **World Health Organization.** 2009. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy.
181 World Health Organization, Geneva.
182 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241597531/en/>. Accessed 3rd June
183 2019.
- 184 10. **World Health Organization.** 2015. Policy brief on single-dose primaquine as a
185 gametocytocide in *Plasmodium falciparum* malaria. WHO, Geneva.
186 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-single-dose-primaquine-pf/en/>.
187 Accessed 3rd June 2019.
- 188 11. **World Health Organization.** 2008. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial
189 drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. World Health Organization,
190 Geneva. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596305/en/>. Accessed 3rd
191 June 2019.
- 192 12. **Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V,**
193 **Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Menard S,**

- 194 Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC,
195 Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Menard D. 2014. A molecular marker
196 of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505:50-55.
- 197 13. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeuung
198 N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy
199 R, Nuel G, Barale JC, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Puijalon O, Arieu F,
200 Menard D. 2017. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum*
201 malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:174-183.
- 202 14. Lin JT, Lon C, Spring MD, Sok S, Chann S, Ittiverakul M, Kuntawunginn W, My M, Thay K,
203 Rahman R, Balasubramanian S, Char M, Lanteri CA, Gosi P, Ubalee R, Meshnick SR,
204 Saunders DL. 2017. Single dose primaquine to reduce gametocyte carriage and *Plasmodium*
205 *falciparum* transmission in Cambodia: An open-label randomized trial. *PLoS One*
206 12:e0168702.
- 207 15. Lin JT, Patel JC, Levitz L, Wojnarski M, Chaorattanakawee S, Gosi P, Buathong N, Chann S,
208 Huy R, Thay K, Sea D, Samon N, Takala-Harrison S, Fukuda M, Smith P, Spring M, Saunders
209 D, Lon C. 2018. Gametocyte Carriage, Antimalarial Use, and Drug Resistance in Cambodia,
210 2008-2014. *Am J Trop Med Hyg* 99:1145-1149.
- 211 16. Rossi G, De Smet M, Khim N, Kindermans JM, Menard D. 2017. Emergence of *Plasmodium*
212 *falciparum* triple mutant in Cambodia. *Lancet Infect Dis* 17:1233.
- 213 17. Dysoley L, Kim S, Lopes S, Khim N, Bjorges S, Top S, Huch C, Rekol H, Westercamp N,
214 Fukuda MM, Hwang J, Roca-Feltrre A, Mukaka M, Menard D, Taylor WR. 2019. The
215 tolerability of single low dose primaquine in glucose-6-phosphate deficient and normal
216 *falciparum*-infected Cambodians. *BMC Infect Dis* 19:250.
217

218 **Figure legend**

219 **Figure 1.** Prevalence of molecular markers associated with resistance to artemisinin (*K13*),
220 piperazine (*Pfpm2*) and mefloquine (*Pfmdr1*).

221

222 Note that data were incomplete for one patient from Trapeng Chau.

223 **Table 1.** Baseline characteristics and population disposition.

Characteristic	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
	Trapeng Chau (N=62)	Veal Veng (N=42)	Trapeng Chau (N=60)	Veal Veng (N=60)
Male/female	60/2	36/6	58/2	59/1
Mean age (SD) [range], years	26.5 (10.4) [7–56]	30.7 (13.7) [9–60]	21.9 (7.9) [6–53]	25.2 (10.8) [8–55]
Mean weight (SD) [range], kg	53.2 (10.8) [20–75]	51.8 (10.7) [20–73]	51.5 (11.0) [20–77]	52.9 (12.5) [22–82]
Geometric mean parasitemia μL^{-1} blood [range]	20,363 [1,530–251,752]	12,875 [892–107,936]	6,801 [1,164–42,435]	6,829 [1,794–21,367]
Safety population	62	42	60	60
PCR-adjusted per-protocol population	59	41	60	60
Withdrawn	0	0	0	0
Lost to follow-up	2	0	0	0
PCR adjustment	1	1	–	–

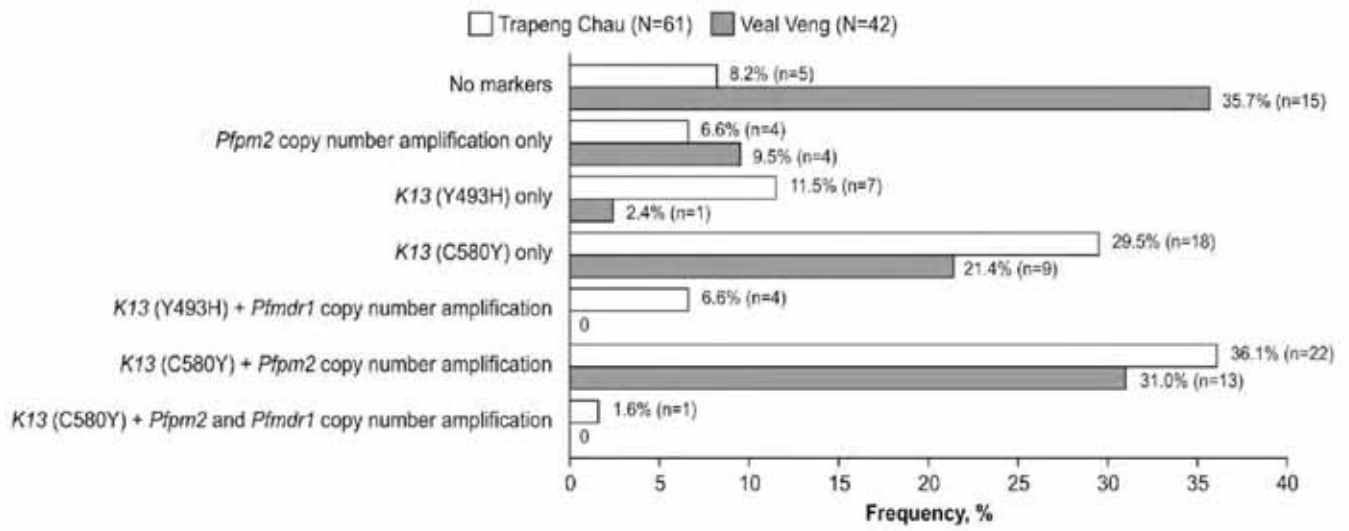
224 PCR, polymerase-chain reaction.

225

226 **Table 2.** Frequency of adverse events of any cause by study day.

Adverse event, %	<i>P. falciparum</i> (N=104)			<i>P. vivax</i> (N=120)		
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 0	Day 1	Day 2
Fever	99.0	56.3	8.8	100	49.2	0.8
Chills	80.8	28.2	2.9	85.8	37.5	0.8
Headache	94.2	58.3	44.1	90.8	53.3	29.2
Nausea	18.3	9.7	3.9	14.2	7.5	0.8
Vomiting	15.4	9.7	1.0	9.2	2.5	0.8
Body pain	84.6	51.5	29.4	75.0	40	10
Fatigue	71.2	34.0	15.7	67.5	30	10.8
Vertigo	31.7	23.3	6.9	23.3	15.8	1.7
Confusion	7.7	4.9	0	1.7	0	0
Insomnia	25.0	6.8	2.0	20.8	3.3	1.7
Deafness	15.4	5.8	0	0	0.8	0
Diarrhea	10.6	7.8	2.0	3.3	1.7	0
Abdominal pain	19.2	13.6	2.9	13.3	11.7	0
Rash	0	0	0	0	0.8	0
Palpitations	1.9	3.9	1.0	0.8	0.8	0
Tachycardia	1.0	0	0	0	0	0

227



B. Action de la ferroquine *in vitro* sur des isolats multi-résistants collectés au Cambodge

1. Introduction

La FQ est une molécule dérivée de la CQ synthétisée dans les années 1990. Elle représente un intérêt certain en tant que nouvel antipaludique puisque c'est l'une des seules molécules pour laquelle la résistance n'a pas pu être induite par pressions répétées chez *P. falciparum in vitro*. Plusieurs études ont démontré son efficacité sur des souches CQ-résistantes (256). La FQ a été testée cliniquement en association avec l'AS. Cette combinaison a été bien tolérée et cliniquement efficace sur les infections à *P. falciparum* en Afrique (257). Cependant, l'efficacité de la FQ sur des isolats multi-résistants n'avait jamais été étudiée. Une étude clinique de phase 2 est en cours au Vietnam afin de confirmer l'efficacité de l'OZ439-FQ en zone de multi-résistance. Le travail ci-après a visé à étudier l'impact de la FQ sur la susceptibilité d'isolats cambodgiens présentant différents haplotypes de résistance à l'ART, PPQ et MQ (polymorphismes du gène *K13*, amplification des gènes *Pm2/3* et *Mdr1*).

2. Discussion/conclusion

Cette étude a démontré l'efficacité de la FQ sur les différents haplotypes de résistance observés au Cambodge (*K13*-mutants présentant une seule copie des gènes *Mdr1* et *Pm2/3*, *K13*-mutants présentant plusieurs copies du gène *Mdr1*, et *K13*-mutants *Pm2/3*-amplifiés). Pour tous ces groupes, la CI_{50} médiane de la FQ était inférieure à 20 nM. Les génotypes de résistance étaient associés à la résistance phénotypique des souches testées : comme attendu, les parasites *K13*-mutants étaient résistants à l'ART, les parasites *Pm2/3*-amplifiés résistants à la PPQ, et les parasites *Mdr1*-amplifiés résistants à la MQ. Des différences minimales mais significatives ont été observées entre les susceptibilités des différents groupes à la FQ. Les parasites *K13*-mutants étaient légèrement moins sensibles à la FQ que les parasites *K13*-sauvages. L'amplification des gènes *Pm2/3* semblait exacerber la tolérance des parasites *K13*-mutants à la FQ. Les parasites *K13*-mutants *Mdr1*-amplifiés étaient de façon inverse plus sensibles à la FQ. Une légère corrélation positive a pu être observée entre les CI_{50} de la FQ et celles de la PPQ, ainsi qu'une corrélation négative entre les CI_{50} de la FQ et de la MQ. Ces

résultats peuvent être expliqués par la similarité structurale de la PPQ et de la FQ, appartenant toutes les deux à la famille des amino-4-quinoléines. On ne peut cependant pas parler de résistance croisée entre la PPQ et la FQ, les parasites testés étant tous sensibles à la FQ malgré les faibles variations observées entre les différents groupes. De plus, l'ordre de grandeur des CI_{50} observé dans cette étude était similaire à celui observé en Afrique (258,259), où les parasites sont sensibles aux CTA. Cette étude confirme donc l'efficacité de la FQ sur les parasites multi-résistants cambodgiens *in vitro*.

3. Article

In vitro activity of ferroquine against artemisinin-based combination therapy (ACT)-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Cambodia

Mélissa Mairet-Khedim, Flore Nardella, Nimol Khim, Saorin Kim, Nimol Kloeung, Sopheakvatey Ke, Chhayleang Kauy, Rotha Eam, Chanra Khean, Alain Pellet, Didier Leboulleux, Rithea Leang, Pascal Ringwald, Jean Christophe Barale, Didier Leroy, Didier Menard and Benoit Witkowski

J. Antimicrob. Chemother. 2019;74(11):3240–3244. DOI : 10.1093/jac/dkz340

In vitro activity of ferroquine against artemisinin-based combination therapy (ACT)-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Cambodia

Mélissa Mairet-Khedim^{1,2†}, Flore Nardella^{3†}, Nimol Khim¹, Saorin Kim¹, Nimol Kloeung¹, Sopheakvatey Ke¹, Chhayleang Kauy¹, Rotha Eam¹, Chanra Khean¹, Alain Pellet⁴, Didier Leboulleux⁴, Rithea Leang⁵, Pascal Ringwald⁶, Jean Christophe Barale^{2,7}, Didier Leroy⁸, Didier Menard^{3‡} and Benoit Witkowski^{1,2*‡}

¹Malaria Molecular Epidemiology Unit, Pasteur Institute in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia; ²Malaria Translational Research Unit, Institut Pasteur, Paris, France; ³Biology of Host-Parasite Interactions Unit, Institut Pasteur, Paris, France; ⁴Evotec ID, Marcy-l'Étoile, France; ⁵National Center for Malariaology, Entomology and Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia; ⁶World Health Organization, Geneva, Switzerland; ⁷Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur, CNRS, Université de Paris, Paris, France; ⁸Medicines for Malaria Venture, Geneva, Switzerland

*Corresponding author. E-mail: bwitkowski@pasteur-kh.org

†M. M.-K. and F. N. contributed equally.

‡D. M. and B. W. contributed equally.

Received 9 January 2019; returned 20 January 2019; revised 9 July 2019; accepted 10 July 2019

Background: Cambodia is the epicentre of resistance emergence for virtually all antimalarial drugs. Selection and spread of parasites resistant to artemisinin-based combination therapy (ACT) is a major threat for malaria elimination, hence the need to renew the pool of effective treatments.

Objectives: To determine whether ACT resistance haplotypes could have an effect on ferroquine *in vitro* antimalarial activity.

Methods: *In vitro* susceptibility to ferroquine was measured for 80 isolates from Cambodia characterized for their molecular resistance profile to artemisinin, piperazine and mefloquine.

Results: Among the 80 isolates tested, the overall median (IQR) IC₅₀ of ferroquine was 10.9 nM (8.7–18.3). The ferroquine median (IQR) IC₅₀ was 8.9 nM (8.1–11.8) for *Pfk13* WT parasites and was 12.9 nM (9.5–20.0) for *Pfk13* C580Y parasites with no amplification of *Pfpm2* and *Pfmdr1* genes. The median (IQR) IC₅₀ of ferroquine for *Pfk13* C580Y parasites with amplification of the *Pfpm2* gene was 17.2 nM (14.5–20.5) versus 9.1 nM (7.9–10.7) for *Pfk13* C580Y parasites with amplification of the *Pfmdr1* gene.

Conclusions: Ferroquine exerts promising efficacy against ACT-resistant isolates. Whereas *Pfpm2* amplification was associated with the highest parasite tolerance to ferroquine, the susceptibility range observed was in accordance with those measured in ACT resistance-free areas. This enables consideration of ferroquine as a relevant therapeutic option against ACT-resistant malaria.

Introduction

Artemisinin-based combination therapy (ACT) deployment has been a major step for malaria elimination. These well-tolerated and extremely effective combinations represent now the gold standard for uncomplicated malaria treatment. The bi-component formulation of ACTs was designed to prevent the risk of drug resistance emergence, by combining a fast-acting drug (artemisinin derivative) with a long-lasting partner. Unfortunately, a few years after ACT implementation, *Plasmodium falciparum* strains multiresistant to artesunate/mefloquine emerged in Cambodia.

This ACT was withdrawn in 2011 from drug policy in Cambodia to be replaced by dihydroartemisinin/piperazine. In 2013, a dramatic treatment failure rate to dihydroartemisinin/piperazine of ~50% was reported.¹ Faced with this situation, Cambodia treatment guidelines have been redefined through the reintroduction of artesunate/mefloquine, irrespective of previous resistance issues. Additionally, an alarming spread of multiresistant strains to the neighbouring countries Thailand, Vietnam and Laos was observed.² This situation raises concerns about malaria elimination feasibility in the Greater Mekong Subregion and advocates for the development of new drugs able to tackle ACT-resistant

parasites. Among the candidates that are being considered for the development pipeline, ferroquine is one of the most promising. This molecule, developed by Biot et al.,³ is basically a chloroquine molecule coupled with a ferrocenyl function. As was found for chloroquine, it was determined that ferroquine acts as an inhibitor of haemozoin biomineralization.⁴ Despite a shared amino-4-quinoline core, it has been demonstrated that chloroquine resistance does not impact ferroquine activity.⁵ Pharmacokinetic properties of ferroquine defined it as a long-lasting molecule. Its safety has been demonstrated⁶ and the ferroquine/artesunate association has met the clinical antimalarial efficacy requirements.⁷ Ultimately, attempts at *in vitro* selection of ferroquine resistance were unsuccessful.⁸ All these green lights make it worth considering ferroquine as an option for next-generation antimalarial combinations. However, in the current resistance context it is crucial to evaluate ferroquine against ACT-resistant isolates that circulate in South-East Asia. This study aimed to determine the *in vitro* activity of ferroquine against parasites collected in Cambodia harbouring genotypes associated with resistance to artemisinin (*Pfk13* single point mutation),⁹ mefloquine (increased copy number of *Pfmdr1*)¹⁰ and piperazine (increased copy number of *Pfpm2*).¹¹

Methods

P. falciparum clinical isolates

Isolates were collected from Cambodian patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria enrolled in WHO therapeutic efficacy studies (2011–14). Venous blood was taken in acid-citrate-dextrose tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Parasites were adapted to *in vitro* culture at 2% haematocrit (O⁺ human blood, Centre de Transfusion Sanguine, Phnom Penh, Cambodia) in RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% Albumax II/2.5% human plasma under an atmosphere of 5% CO₂/5% O₂. Adapted parasites were cryopreserved and thawed upon performance of susceptibility assays. Reference strains 3D7, 7G8, W2 and DD2 were provided by the MR4 (Virginia, USA) and cultured under the same conditions.

Molecular resistance marker determination

Pfk13 propeller domain (PF3D7_1343700 from codon 445 to 680) polymorphism was determined by Sanger sequencing according to Ariey et al.⁹ *Pfmdr1* and *Pfpm2* copy number variations were determined by quantitative PCR according to Witkowski et al.¹¹

In vitro susceptibility assay

Parasite *in vitro* susceptibility to ferroquine and mefloquine was determined by using a [³H]hypoxanthine uptake inhibition assay.¹² Ferroquine was obtained from Sanofi (Marcy-l'Étoile, France) and piperazine, dihydroartemisinin and mefloquine were obtained from WWARN; DMSO (Sigma-Aldrich, Singapore) was used as a vehicle. Parasites were synchronized at ring stage with D-sorbitol treatment (0–12 h post-invasion) and exposed to a concentration range of ferroquine (0.7–500 nM) or mefloquine (2.1–1500 nM) for 48 h in the presence of 0.5 μCi of [³H]hypoxanthine (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Tritium incorporation was measured with a β-counter (Trilux Microbeta; PerkinElmer). IC₅₀ values were determined using ICEstimator software (<http://www.antimalarial-icestimator.net>). Parasite susceptibility to dihydroartemisinin and piperazine was measured using ring-stage survival assay (RSA) and piperazine survival assay (PSA) methods, respectively.^{9,11}

Ethics

All isolates were collected from therapeutic efficacy studies (TESS) approved by the Ethics Committee for Health Research of the Cambodian Ministry of Health and registered at the Australian New Zealand Clinical Trials Registry (numbers ACTRN 12615000793516, 12612000184875, 12612000183886, 12612000181808 and 12614000344695).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad 7.0 software. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

Among the isolates collected in Cambodia from 2011 to 2014, 80 were selected according to their drug resistance genotypes and sorted into four groups of 20 isolates: Group 1, *Pfk13* WT, one copy of *Pfpm2* and *Pfmdr1*; Group 2, *Pfk13* C580Y, one copy of *Pfpm2* and *Pfmdr1*; Group 3, *Pfk13* C580Y, one copy of *Pfpm2* and amplification of *Pfmdr1*; and Group 4, *Pfk13* C580Y, amplification of *Pfpm2* and one copy of *Pfmdr1*. As well as ferroquine, susceptibilities to dihydroartemisinin, mefloquine and piperazine were determined. Values were, as expected, consistent with the molecular profiles of resistance, showing a higher resistance of the parasites to dihydroartemisinin, mefloquine and piperazine along with, respectively, *Pfk13* C580Y mutation, *Pfmdr1* amplification and *Pfpm2* amplification (Table 1). The median (IQR, range) IC₅₀ value for these 80 isolates of ferroquine was 10.9 nM (8.7–18.3, 6.8–24.2). In comparison, the median (IQR, range) IC₅₀ value obtained for reference strains (3D7, W2, DD2 and 7G8) was 9.4 nM (6.8–18.9, 3.2–20.9). The median IC₅₀ value for ferroquine was not different between clinical isolates and reference strains (*P*=0.21, Mann-Whitney test).

Ferroquine susceptibility was then analysed after stratification by parasite groups. The isolates of Group 1 showed a median (IQR) IC₅₀ value of 8.9 nM (8.1–11.8) and those of Groups 2, 3 and 4 showed a median (IQR) IC₅₀ value of 12.9 nM (9.5–20.0), 9.1 nM (7.9–10.7) and 17.2 nM (14.5–20.5), respectively. Compared with isolates of Group 1, the isolates of Groups 2 and 4 were significantly less susceptible to ferroquine (*P*=0.0066 and <0.0001, respectively, Mann-Whitney test). In contrast, ferroquine susceptibility of the isolates of Group 3 did not differ from that of the isolates of Group 1 (*P*=0.70). Considering that the molecular profile of resistance is only qualitative, the correlations between ferroquine and dihydroartemisinin, piperazine and mefloquine susceptibilities were addressed phenotypically (Figure 1). No correlation was observed between ferroquine and dihydroartemisinin susceptibilities (*r*=0.06). However, a slight positive correlation was observed with piperazine (*r*=0.40) and a moderate negative correlation was observed with mefloquine (*r*=−0.42).

Discussion

Ferroquine activity was assessed here against a parasite population that has been subjected for several years to artesunate/mefloquine and dihydroartemisinin/piperazine selective pressure and exhibits evidence of resistance to these regimens.

The ferroquine activity against these isolates [geometric mean IC₅₀=13.0 nM (95% CI=11.9–14.2)] was surprisingly similar to the data obtained in Africa against parasite populations naive to ACT selective pressure and using the same testing methodology [1.0–

Table 1. *In vitro* susceptibility to ferroquine, mefloquine, piperazine and dihydroartemisinin of reference *P. falciparum* laboratory strains and culture-adapted isolates presenting different molecular patterns of resistance to artemisinin (*Pfk13* gene WT or C580Y), piperazine (*Pfpm2* gene=1 or >1 copy) and mefloquine (*Pfmdr1* gene=1 or >1 copy)

Isolates	Ferroquine median IC ₅₀ (nM)	Mefloquine median IC ₅₀ (nM)	Piperazine median PSA survival (%)	Dihydroartemisinin median RSA survival (%)
Group 1: K13 WT CN_PM2=1 CN_MDR1=1	8.9 (8.1–11.8) n=20	45.0 (37.0–58.0) n=20	0.0 (0.0–0.3) n=19	0.0 (0.0–0.3) n=20
Group 2: K13 C580Y CN_PM2=1 CN_MDR1=1	12.9 (9.5–20.0) n=20	43.9 (19.9–54.2) n=20	0.0 (0.0–8.5) n=20	11.6 (4.8–18.2) n=20
Group 3: K13 C580Y CN_PM2=1 CN_MDR1 >1	9.1 (7.9–10.7) n=20	90.5 (70.7–106.5) n=20	0.0 (0.0–0.4) n=20	12.5 (6.6–19.6) n=20
Group 4: K13 C580Y CN_PM2 >1 CN_MDR1 =1	17.2 (14.5–20.5) n=20	20.6 (8.9–29.5) n=20	31.7 (21.8–46.6) n=19	6.9 (3.2–10.9) n=19
3D7	6.3 (5.1–7.7) n=9	32.7 (28.7–38.3) n=9	0.0 (0.0–0.0) n=9	0.0 (0.0–0.0) n=9
7G8	19.7 (19.4–20.7) n=5	NA	NA	NA
DD2	10.8 (8.8–15.5) n=4	NA	NA	NA
W2	14.9 (11.7–18.7) n=3	NA	NA	NA

NA, not available.

Values in parentheses are IQRs.

62.0 nM in Gabon (2003)¹³ and 0.5–28.2 nM in Senegal (2002)¹⁴. This result was also similar to data for parasites obtained on the Thai–Burma border in 2004–05 (mean IC₅₀ = 9.3 nM) immediately after the introduction of ACTs.¹⁵ However, this simple consideration of IC₅₀ values is insufficient to evaluate the impact of ACT resistance on ferroquine susceptibility. Therefore, determination of ferroquine susceptibility has been stratified across the different resistance genotypes associated with ACT resistance. A mild elevation of IC₅₀ was noted for strains presenting a *Pfk13* C580Y allele compared with a WT allele. Like artemisinin derivatives, ferroquine was categorized as a potentially pro-oxidant molecule.¹⁶ In this context, we can hypothesize that the *Pfk13* mutation impacts ferroquine susceptibility in addition to affecting susceptibility to

artemisinin derivatives through oxidative stress management. However, and given the absence of cross-resistance to dihydroartemisinin *in vitro*, it is unlikely that this putative feature would be a major determinant of parasite resistance to ferroquine. More interestingly, the results have shown that amplification of *Pfmdr1* did have an impact on ferroquine activity and a negative correlation between susceptibilities to ferroquine and mefloquine was noted. In contrast, *Pfpm2* amplification was associated with increased tolerance to ferroquine and a positive correlation was observed between susceptibilities to ferroquine and piperazine. Resistance to mefloquine leads to increased susceptibility of the parasites to piperazine.¹⁷ Similarly, resistance to mefloquine also causes increased susceptibility of the parasites to ferroquine. The shared

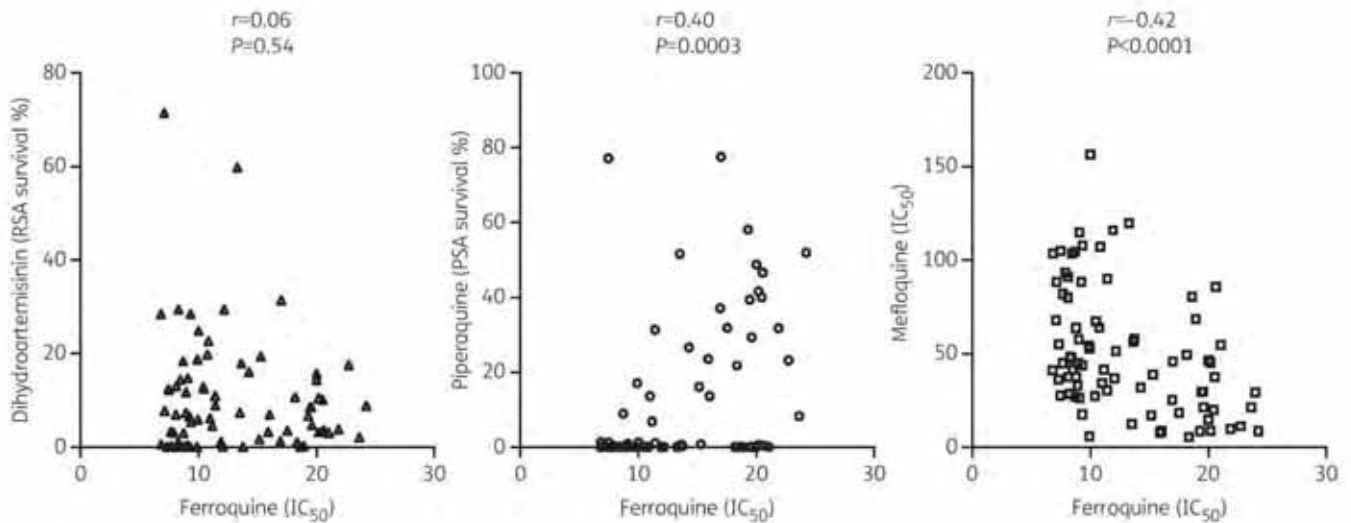


Figure 1. Cross-susceptibility of Cambodian isolates to ferroquine versus dihydroartemisinin ($n=79$), piperquine ($n=78$) and mefloquine ($n=80$). Each symbol corresponds to one isolate tested. r , Spearman correlation. No strong correlation was observed between susceptibility to ferroquine and other drugs tested. The Spearman test was used to perform statistical analyses. IC_{50} values are given in terms of nM.

amino-4-quinoline function between piperquine and ferroquine could be an explanation, as well as an involvement of *Pfmdr1* in the modulation of ferroquine accumulation in the parasite. *Pfpm2* could also play a role, but the limited mechanistic data available do not enable us to propose a solid hypothesis yet.

Whereas slight tolerance of highly piperquine-resistant strains to ferroquine was observed, it should be noted that the IC_{50} values observed remain in the range of laboratory isolates such as W2, far below the highest values observed in Africa and largely under the expected plasma concentration ($C_{max} = 155$ ng/mL) after administration of a single dose of 800 mg of ferroquine.¹⁸

This study nevertheless has some limitations: the susceptibility cut-off associated with clinical resistance to ferroquine is unknown; the impact of current resistance patterns on ferroquine activity was only investigated through the prism of the molecular markers considered here; and the impact of other genotypes, especially *Pfcr1* polymorphisms, should be addressed further. Finally, a limited number of isolates have been tested and we cannot assume that strains much more resistant to ferroquine do not circulate in Cambodia already.

In summary, this study demonstrates the modest impact of artemisinin derivative, piperquine and mefloquine resistance on ferroquine activity. Ferroquine can be rationally considered as a major candidate for the development of next-generation anti-malarial drugs that would result in sustainable malaria control in areas with ACT resistance.

Acknowledgements

We would like to thank the patients who participated in TESs and the Cambodian Health Centre medical staff for their contribution.

Funding

This study was supported by Medicines for Malaria Venture (project RD/13/0002). M. M.-K. and B. W. were supported by 5% initiative [molecular and *in vitro* surveillance of ACT partner drug efficacy in the Greater

Mekong Subregion (MIVS-ACT), grant #15SANIN211]. F. N. was supported by Foundation Pierre Ledoux.

Transparency declarations

A. P. and D. L. are employees of Evotec ID. P. R. is a staff member of the WHO; P. R. alone is responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the decisions, policy or views of the WHO. All other authors: none to declare.

References

- Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C. Dihydroartemisinin-piperquine failure in Cambodia. *N Engl J Med* 2014; **371**: 484–5.
- Irwong M, Suwannasin K, Kunasol C et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 491–7.
- Biot C, Glorian G, Maciejewski LA et al. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J Med Chem* 1997; **40**: 3715–8.
- Biot C, Taramelli D, Farfar-Bares I et al. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiparasitic activity. *Mol Pharm* 2005; **2**: 185–93.
- Kreidenweiss A, Kremsner PG, Dietz K et al. *In vitro* activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 2006; **75**: 1178–81.
- Mombo-Ngoma G, Supan C, Dal-Bianco MP et al. Phase I randomized dose-ascending placebo-controlled trials of ferroquine—a candidate anti-malarial drug—in adults with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. *Malar J* 2011; **10**: 53.
- Walsh DS, Lell B, Kombila M et al. Phase 2a, open-label, 4-escalating-dose, randomized multicenter study evaluating the safety and activity of ferroquine (SSR97193) plus artesunate, versus amodiaquine plus artesunate, in African adult men with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2017; **97**: 514–25.
- Daher W, Biot C, Fandeur T et al. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar J* 2006; **5**: 11.

- 9** Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2013; **505**: 50–5.
- 10** Price RN, Cassar C, Brockman A et al. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2943–9.
- 11** Witkowski B, Duru V, Khim N et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 174–83.
- 12** Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **16**: 710–8.
- 13** Atteke C. *In vitro* susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooue region of Gabon. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1021–4.
- 14** Pradines B, Tall A, Rogier C et al. *In vitro* activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2002; **7**: 265–70.
- 15** Barends M, Jaidee A, Khaohirun N et al. *In vitro* activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malar J* 2007; **6**: 81.
- 16** Chavain N, Vezin H, Dive D et al. Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial. *Mol Pharm* 2008; **5**: 710–6.
- 17** Bopp S, Magistrado P, Wong W et al. Plasmeprin II–III copy number accounts for bimodal piperazine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 2018; **9**: 1769.
- 18** McCarthy JS, Rückle T, Djeriou E et al. A Phase II pilot trial to evaluate safety and efficacy of ferroquine against early *Plasmodium falciparum* in an induced blood-stage malaria infection study. *Malar J* 2016; **15**: 469.

C. Résistance clinique et *in vitro* de *P. falciparum* à l'artésunate-amodiaquine au Cambodge

1. Introduction

L'ASAQ (ASAQ Winthrop®) est l'une des cinq CTA de première ligne recommandées par l'OMS. Son utilisation a été validée en 2008, et est aujourd'hui enregistrée dans 33 pays (Afrique centrale, Afrique de l'Ouest et Colombie) (260). Cette combinaison a largement contribué à la diminution de prévalence du paludisme en Afrique depuis son introduction. Elle présente l'avantage d'être la moins chère des CTA distribuées par le Global Fund et les partenaires du secteur public (260). L'efficacité clinique de ce traitement a été validée dans de nombreux pays, malgré une grande variation observée entre les résultats des différentes études (261). En Asie du Sud-Est, seul le Vietnam a déjà testé cliniquement ce traitement, avec 98% d'efficacité (262,263).

L'étude présentée ci-après a été réalisée en 2016-2017. Elle a eu pour but d'étudier l'efficacité de l'ASAQ + PQ au Cambodge sur des infections non compliquées à *P. falciparum*. Il a en effet été supposé que l'ASAQ pourrait être efficace sur les parasites multi-résistants cambodgiens, l'AQ n'ayant été que très peu utilisée en Asie du Sud-Est. De plus, aucune étude n'a fait état de la résistance à l'AQ au Cambodge. Certains polymorphismes dans le gène *Mdr1* (principalement N86Y) ont cependant été associées à la résistance à l'AQ en Afrique et en Amérique du Sud (264). Il était donc intéressant d'observer la susceptibilité des parasites du Cambodge à cette combinaison, et d'identifier les marqueurs moléculaires de résistance associés à des potentiels échecs thérapeutiques. Cette étude a aussi permis de mettre au point un nouveau test phénotypique d'évaluation de la susceptibilité à l'AQ basé sur le PSA, plus adapté que la méthode conventionnelle de détermination de la CI_{50} .

2. Conclusion/discussion

L'efficacité clinique de l'ASAQ observée au cours de cette étude (% ACPR à jour 28, corrigé par PCR) était de 81%. Les échecs tardifs étaient tous dus à des recrudescences, observées entre les jours 21 et 28 de traitement. Le haut pourcentage d'échecs thérapeutiques observé s'explique principalement par la résistance à l'AQ. Ce résultat était inattendu compte tenu de l'utilisation restreinte de ce composé au Cambodge depuis les années 1990. Les 63 isolats collectés étaient tous *K13-C580Y*, donc résistants à l'ART. 85,7% de ces isolats présentaient une amplification des gènes *Pm2/3*, mais aucun n'était *Mdr1*-amplifié. La CI_{50} moyenne de l'AQ observée pour les 63 isolats par test isotopique d'incorporation d'hypoxanthine tritiée était de 174,5 nM, bien plus haute que les valeurs précédemment observées en Afrique (265–267). Cependant, cette technique ne permettait pas de discriminer suffisamment les échecs des ACPR (CI_{50} médiane de 193 nM pour les recrudescences et 165 nM pour les ACPR à jour 28). Un autre test phénotypique a pour cela été développé : l'AQSA (Amodiaquine Survival Assay). Ce test de survie se base sur le même protocole que le PSA. La médiane de survie parasitaire avec l'AQSA était de 23,5%. Une forte corrélation positive a pu être observée entre les susceptibilités à l'AQ obtenues par AQSA et par test isotopique. Cependant, l'AQSA permettait de mieux discriminer les ACPR des échecs cliniques (13,3% de survie pour les ACPR, 64% de survie pour les recrudescences). Le seuil de résistance associé à un risque de survenue d'échec clinique a été fixé à >44% de survie par AQSA, cette valeur représentant le meilleur compromis sensibilité/spécificité. Ce seuil de résistance a ensuite été utilisé pour réaliser une étude moléculaire permettant d'identifier un ou plusieurs marqueurs associés à la résistance à l'AQ par séquençage du génome complet. En premier lieu, la présence de marqueurs moléculaires de résistance à l'AQ précédemment identifiés en Afrique (*Mdr1* N86Y/Y184F/D1246Y) et en Amérique du Sud (*Mdr1* S1034C, N1042D and D1246Y) a été recherchée. Aucun des isolats cambodgiens collectés au cours de cette étude ne présentait ces marqueurs. L'amplification des gènes *Pm2/3* n'impactait pas non plus la susceptibilité à l'AQ. En revanche, les mutations Y184F/S784L/R945P dans le gène *Mdr1* ont été associées à la résistance à l'AQ par AQSA. La quasi-totalité des isolats présentaient un fond génétique

Dd2 du gène *Crt*. 85,9% des isolats présentaient des mutations additionnelles dans le gène *Crt*. La plupart de ces mutations (T93S majoritaire) n'avaient pas d'impact sur la susceptibilité à l'AQ. En revanche, les mutations G353V et F145I associées à la résistance à la PPQ étaient significativement associées à la susceptibilité accrue des parasites à l'AQ.

En Afrique, les polymorphismes N86Y-Y184F-D1246Y du gène *Mdr1* sont sélectionnés par la LM et semblent sensibiliser les parasites à l'AQ (268). Cette observation a encouragé le développement d'une triple combinaison AS-LM-AQ. Aucun polymorphisme associé à des variations de susceptibilité à l'AQ en Afrique n'ayant été identifié dans cette étude, cette triple-combinaison semble donc possiblement inadaptée au Cambodge.

Cette étude a cependant été réalisée sur un petit nombre de patients, et sur une durée de 28 jours. Un plus grand nombre d'échantillons sont actuellement testés en AQSA à l'Institut Pasteur du Cambodge, afin d'affiner la recherche de marqueurs moléculaires de résistance à l'AQ.

En conclusion, ces résultats ne satisfont pas les critères de validation des CTA par l'OMS. L'ASAQ n'est donc pas un traitement adapté pour le traitement des infections à *P. falciparum* au Cambodge. Les raisons de l'émergence de la résistance à l'AQ au Cambodge restent inconnues. L'utilisation massive de la CQ pourrait avoir favorisé la sélection de clones AQ-résistants. Grâce au développement de l'AQSA, le profil moléculaire de résistance à l'AQ des parasites cambodgiens a pu être observé et s'avère être différent de celui des parasites africains. L'AQSA pourrait aussi être utilisé en Afrique pour évaluer la surveillance de l'efficacité de l'ASAQ.

3. Article

Clinical and *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-amodiaquine in Cambodia

Melissa Mairet-Khedim, Rithea Leang, Camille Marmai, Nimol Khim, Saorin Kim, Sopheakvatey Ke, Chhayleang Kauy, Nimol Kloeung, Rotha Eam, Sophy Chy, Brigitte Izac, Denis Mey Bouth, Maria Dorina Bustos, Pascal Ringwald, Frederic Arieu, Benoit Witkowski

Article soumis dans le journal « Clinical Infectious Diseases », en cours de réponse après revue.

1 **Clinical and *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-**
2 **amodiaquine in Cambodia**

3

4 Melissa Mairet-Khedim^{1,2,3}, Rithea Leang⁴, Camille Marmai⁵, Nimol Khim^{1,2}, Saorin Kim^{1,2},
5 Sopheakvatey Ke^{1,2}, Chhayleang Kauy^{1,2}, Nimol Kloeung^{1,2}, Rotha Eam^{1,2}, Sophy Chy^{1,2}, Brigitte Izac,⁶
6 Denis Mey Bouth⁷, Maria Dorina Bustos⁸, Pascal Ringwald⁹, Frederic Arieu⁶, Benoit Witkowski^{1,2#}

7

8 ¹Malaria Molecular Epidemiology Unit, Institut Pasteur in Cambodia, Phnom Penh, Cambodia.

9 ²Malaria Translational Research Unit, Institut Pasteur, Paris, France ³Center for Pathophysiology

10 Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM, CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France. ⁴National Center

11 for Parasitology, Entomology and Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia; ⁵Institute of Functional

12 Genomics, CNRS, INSERM, University of Montpellier and Labex ICST Montpellier, France; ⁶INSERM

13 1016, Institut Cochin, Université of Paris and Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin,

14 Paris, France. ⁷World Health Organization, Phnom Penh, Cambodia; ⁸World Health Organization,

15 Bangkok, Thailand. ⁹World Health Organization, Geneva, Switzerland

16 MMK & RL contributed equally; FA & BW contributed equally

17

18 Running head: Artesunate-amodiaquine resistance in Cambodia

19 Word count: 2997

20 Keywords: artesunate-amodiaquine, artemisinin, *Plasmodium falciparum*, Cambodia, drug

21 resistance.

22

23 #Address correspondence to:

24 Dr Benoit Witkowski

25 Institut Pasteur du Cambodge

26 5 Preah Monivong Blvd (93), Phnom Penh, Cambodia

27 E-mail: bwitkowski@pasteur-kh.org

28 **Summary**

29 Artesunate-amodiaquine has inadequate efficacy in Cambodian patients with uncomplicated
30 falciparum malaria. Amodiaquine resistance is present in Cambodia and not associated with
31 molecular markers reported in Africa and South America.

32 **Abstract**

33 **Background**

34 Artesunate-amodiaquine is a potential therapy for uncomplicated malaria in Cambodia.

35 **Methods**

36 Between September 2016 and January 2017, artesunate-amodiaquine efficacy and safety were
37 evaluated in a prospective, open-label, single-arm observational study at health centers in
38 Mondulhiri, Pursat and Siem Reap Provinces, Cambodia. Adults and children with microscopically-
39 confirmed *Plasmodium falciparum* malaria received oral artesunate-amodiaquine once daily for
40 three days plus single-dose primaquine, with follow-up on Days 7, 14, 21 and 28. The primary
41 outcome was Day-28 PCR-adjusted adequate clinical and parasitological response (ACPR). An
42 amodiaquine parasite survival assay (AQSA) was developed and applied to whole genome
43 sequencing results to evaluate potential amodiaquine resistance molecular markers.

44 **Results**

45 In 63 patients, Day-28 PCR-adjusted ACPR was 81.0% (95% confidence interval [CI], 68.9–88.7). Day 3
46 parasite positivity rate was 44.4% (28/63; 95%CI, 31.9–57.5). All 63 isolates had the *K13*(C580Y)
47 marker for artemisinin resistance; 79.4% (50/63) had *Pfpm2* amplification. The AQSA resistance
48 phenotype ($\geq 45\%$ parasite survival) was expressed in 36.5% (23/63) of isolates and was significantly
49 associated with treatment failure ($P = 0.0020$). *Pfmdr1* mutant haplotypes were N86/184F/D1246
50 and *Pfcr1* was CVIET or CVIDT at positions 72–76. Additional *Pfcr1* mutations were not associated
51 with amodiaquine resistance, but the G353V mutant allele was associated with ACPR compared to

52 *Pfmdr1* haplotypes harboring F1068L or S784L/R945P mutations ($P = 0.030$ and $P = 0.0004$,
53 respectively).

54 **Conclusions**

55 For uncomplicated falciparum malaria in Cambodia, artesunate-amodiaquine had inadequate
56 efficacy owing to amodiaquine-resistant *P. falciparum*. Amodiaquine resistance was not associated
57 with previously identified molecular markers.

58 Introduction

59 Malaria remains a threat to about half of the world's population [1]. Artemisinin-based combination
60 therapy (ACT) includes a rapid-acting artemisinin with a longer-acting partner drug. ACTs have
61 supported effective malaria treatment globally, contributing to recent declines in mortality [1]. In
62 2006, reduced ACT clinical efficacy in Cambodia's western provinces led to the confirmation of
63 artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* [2], subsequently verified in multiple studies [3].
64 Although artemisinin resistance delays parasite killing, resistance to the partner drug is required
65 before treatment failure rates increase [4, 5]. Unfortunately, *P. falciparum* resistant to artemisinins
66 and partner drugs (piperaquine, mefloquine) circulate in Cambodia and the Greater Mekong sub-
67 region, undermining clinical efficacy and limiting treatment options [1, 6-8].

68

69 Artesunate-amodiaquine was not deployed systematically in Cambodia and requires evaluation as a
70 potential replacement for failing ACTs. In Africa, artesunate-amodiaquine is used extensively with
71 good clinical efficacy – 98.5% in an analysis of 96 studies [1]. In Africa, *P. falciparum* with *multi-drug*
72 *resistance 1* (*Pfmdr1*) alleles N86Y/Y184/D1246Y (YYY haplotype) is associated with amodiaquine
73 treatment failures [9], but has not been detected in Cambodia [10]. The most prevalent *chloroquine*
74 *resistance transporter gene* (*Pfcr*) haplotype in Cambodia is CVIET at positions 72-76 (wild-type
75 CVMNT) [10], which is also prevalent in Africa [11, 12], and insufficient to confer amodiaquine
76 resistance *in vivo* [13, 14]. In Viet Nam, two recent artesunate-amodiaquine clinical trials showed
77 encouraging results with Day-42 PCR-adjusted adequate clinical and parasitological cure rates (ACPR)
78 of 98% [15, 16].

79

80 This study investigated artesunate-amodiaquine clinical efficacy for uncomplicated falciparum
81 malaria in Cambodia. In the event of clinical failures, molecular markers associated with
82 amodiaquine resistance were to be investigated.

83 **Methods**

84 ***Study design***

85 This prospective, single-arm, open-label therapeutic efficacy trial of artesunate-amodiaquine plus
86 single-dose primaquine was conducted between September 2016 and January 2017 at three health
87 centers in Cambodia: Koh Gnek (Koh Gnek district, Mondulkiri province), Promoy (Veal Veng district,
88 Pursat province), and Khvav (Chi Kraeng district, Siem Reap province) (Figure 1).

89

90 The study confirmed to Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki (2000). The protocol
91 followed the standard World Health Organization protocol for the surveillance of antimalarial
92 treatment efficacy [17], and was approved by National Cambodian Ethical board and the World
93 Health Organization Regional Office, Western Pacific Region. Owing to an administrative error, this
94 study was registered retrospectively at <https://www.anzctr.org.au> (identifier
95 ACTRN12619001628134). All patients or their guardians provided written informed consent.
96 Additionally, assent was obtained from children aged 12 years and above.

97 ***Patients***

98 Eligible patients were aged 5–60 years with microscopically confirmed *P. falciparum* mono-infection
99 ($1000\text{--}250,000\ \mu\text{L}^{-1}$ blood), fever or history of fever during the past 24 h and able to swallow oral
100 medication. Unmarried girls and women aged 12–18 years, pregnant and lactating women were
101 excluded. All women of child-bearing potential had a pregnancy test. Exclusion criteria were severe
102 falciparum malaria, severe malnutrition, febrile conditions other than malaria or other underlying
103 chronic illness, medication that might interfere with antimalarial pharmacokinetics, or a history of
104 hypersensitivity to artemisinin or amodiaquine.

105 **Treatment**

106 Artesunate-amodiaquine (ASAQ Winthrop®, Sanofi, Paris, France) was administered under
107 supervision once-daily for three days. Doses were determined by bodyweight to achieve 4
108 mg/kg/day (range 2–10 mg/kg) artesunate and 10 mg/kg/day (range 7.5–15 mg/kg) amodiaquine.
109 Primaquine was given as a single 15 mg dose (0.25 mg base/kg). All patients were treated as in-
110 patients with out-patient follow-up visits on Days 7, 14, 21, and 28. Any recurrence during the
111 follow-up period was treated with artesunate-mefloquine, according to national recommendations.

112 **Procedures**

113 At enrollment, a clinical examination was performed and a full medical history taken. Adverse events
114 were recorded at all study visits. Parasitemia and *Plasmodium* species identification was assessed
115 using Giemsa stained thick and thin blood films obtained at screening, every day following the first
116 treatment dose until samples were parasite negative, at each weekly follow-up visit, and if clinically
117 indicated. Parasite counts were recorded as the average from two microscopists using standard
118 methods [17]. Treatment failures were verified as recrudescence using polymerase chain reaction
119 (PCR) genotyping by comparing *P. falciparum* genes *msp1*, *msp2* and *glurp* in pre-treatment blood
120 samples versus those obtained at recurrence [18].

121 **Molecular surveillance**

122 Using published methods, the *Kelch13* (*K13*) gene was sequenced to identify mutations associated
123 with artemisinin resistance [19]. Gene copy numbers for *P. falciparum plasmepsin 2/3* (*Pfpm2*) and
124 *Pfmdr1* were determined with qPCR using standard protocols, with the threshold for gene
125 amplification defined as >1.5 copies [20].

126 **Amodiaquine susceptibility in vitro**

127 Pre-treatment blood samples were collected into acid-citrate-dextrose tubes (Becton-Dickinson,
128 Franklin Lakes, NJ, USA) and processed within 48 h at Institut Pasteur, Cambodia. Clinical isolates
129 were culture adapted using standard methods [4]. *P. falciparum* reference strains 3D7 (amodiaquine

130 susceptible, from MR4) and 7G8 (amodiaquine resistant, from the European Malaria Reagent
131 Repository) were similarly maintained and used as controls.

132

133 *In vitro* susceptibility to mono-desethyl-amodiaquine (from the WorldWide Antimalarial Resistance
134 Network) was assessed using the [³H]-hypoxanthine assay, according to published methods [4].

135 Inhibitory concentration values (IC₅₀) were determined using ICEstimator software

136 (<http://www.antimalarial-icestimator.net>).

137

138 The amodiaquine survival assay (AQSA) was based on a similar assay for piperaquine [21]. Tightly
139 synchronized ring-stage parasites (0–3 h post-invasion) were exposed to 200 nM mono-desethyl-
140 amodiaquine for 48 h and maintained for a further 24 h in drug-free medium. Live parasites were
141 then enumerated microscopically from Giemsa-stained thin blood films on examination of ≥10,000
142 erythrocytes. Parasite survival following exposure to mono-desethyl-amodiaquine was determined
143 as a percentage relative to untreated controls.

144 ***Amodiaquine resistance and association with molecular markers***

145 Investigation of potential molecular markers associated with amodiaquine resistance used an

146 expanded data set including *P. falciparum* isolates from this study plus 34 clinical isolates collected

147 from sentinel sites (10 Kampong Speu, 13 Mondulkiri, 3 Pursat, 8 Ratanakiri) between February 2017

148 and February 2018.

149

150 *Pfcr* and *Pfmdr1* were sequenced using whole genome sequencing with Illumina paired-reads

151 sequencing, according to published protocols [19, 20]. After processing, data were integrated into

152 the Whole-genome Data Manager (version 2.0) [19, 20]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

153 were investigated using Phen2gen software [20]

154 **Outcomes**

155 The primary efficacy outcome was adequate clinical and parasitological response (ACPR) at Day 28
156 adjusted for reinfection using PCR-genotyping. Day 3 parasite positivity rate was the secondary
157 efficacy outcome. Safety outcomes were the frequency of adverse events, serious and severe
158 adverse events.

159 **Statistical analysis**

160 Data were analyzed with Excel StatX and Graphpad Prism (version 8.3.0). Kaplan–Meier survival
161 curves and associated 95% confidence intervals (95%CI) were used for ACPR with the log-rank test
162 (Mantel–Cox) for comparisons. IC₅₀ and AQSA values versus clinical outcome were compared using
163 the Mann–Whitney test. Resistance thresholds for IC₅₀ and AQSA parasite survival were determined
164 with receiver operating characteristic (ROC) analysis. Kruskal–Wallis tests were used to identify
165 significant differences in *Pfcr*–*Pfmdr1* haplotype AQSA parasite survival results. Significant *p* values
166 were <0.05.

167 **Results**

168 **Patients**

169 Most patients were adult males (87.3% 55/63) (Table 1). There were no withdrawals or patients lost
170 to follow up; all 63 patients were included in the analysis. Thirty-one patients were from Mondulkiri,
171 29 from Pursat and 3 from Siem Reap.

172 **Therapeutic efficacy and molecular surveillance**

173 Day-28 ACPR was 81.0% (51/63). All recurrences were late clinical failures (days 21–28) and PCR-
174 confirmed as recrudescence; nine were in adults (18–52 years) and three in children (8–15 years).
175 The Kaplan–Meier Day-28 ACPR estimate was 81.0% (95%CI, 68.9–88.7) (Figure 2) overall; 77.4%
176 (95%CI, 58.4–88.5) for Mondulkiri, 86.2% (95%CI, 67.3–94.6) for Pursat, and 66.7% (95%CI, 5.4–94.5)
177 for Siem Reap. No severe or serious adverse events were reported during the study.

178

179 Day 3 parasite positivity rate was 44.4% (28/63; 95%CI, 31.9–57.5) overall, 22.6% (7/31; 95%CI, 9.6–
180 41.1) for Mondulkiri, 69.0% (20/29; 95%CI, 49.2–84.7) for Pursat, and 33.3 (1/3, 95%CI, 0.8–90.6) for
181 Siem Reap. Consistent with the delay in parasite clearance, all 63 isolates had the *K13(C580Y)*
182 marker for artemisinin resistance. None had increased *Pfmdr1* copy number, but 85.7% (54/63) had
183 *Pfpm2* amplification.

184 **In vitro amodiaquine resistance**

185 In the [³H]-hypoxanthine assay, the mono-desethyl-amodiaquine median IC₅₀ for the 63 clinical
186 isolates was 174.5 nM (interquartile range [IQR] 90.7–213.1). Isolates from patients with
187 recrudescence (n=12) had a median IC₅₀ of 193.8 nM (IQR 156.6–240.3) versus 165.0 nM (IQR 88.3–
188 212.0) for patients with Day-28 ACPR (n=51) (*P* = 0.084, Mann–Whitney) (Figure 3A). ROC analysis
189 indicated an IC₅₀ threshold value most strongly correlated with Day-28 ACPR of <181 nM (Figure 3B),
190 though sensitivity was only 61% (95%CI, 47–73) at a specificity of 75% (95%CI, 47–91), and area
191 under the curve (AUC) was 0.66 (95%CI, 0.49–0.83; *P* = 0.083). Thus, IC₅₀ had inadequate
192 discriminatory value for predicting clinical outcome.

193 **Amodiaquine survival assay (AQSA)**

194 In the 63 clinical isolates, median parasite survival was 23.5% (IQR 1.6–65.5). AQSA quality control
195 values were 72.8% parasite survival for the amodiaquine-resistant 7G8 strain and 0% for the
196 susceptible 3D7 strain. There was a strong positive correlation between IC₅₀ and AQSA parasite
197 survival (Pearson *r* value 0.75 [95%CI, 0.62–0.84] *P* < 0.0001) (Figure 4A). Recrudescence isolates had a
198 significantly higher median survival (64.0% [IQR 29.1–77.0]) versus those from patients with Day-28
199 ACPR (13.3% [IQR 0.9–48.1]) (*P* = 0.0054, Mann–Whitney) (Figure 3B). ROC analysis indicated an
200 AQSA threshold predictive of Day-28 ACPR of <45% survival, with a sensitivity of 75% (95%CI, 47–91)
201 and specificity of 73% (95%CI, 59–83); AUC was 0.75 (95%CI, 0.60–0.91; *P* = 0.0063) (Figure 4C).
202 ACPR occurred with 92.5% (37/40) of isolates with <45% AQSA parasite survival but decreased

203 significantly to 60.9% (14/23) for those with $\geq 45\%$ survival ($P = 0.0020$, log-rank Mantel–Cox) (Figure
204 4D). Therefore, $\geq 45\%$ parasite survival in the AQSA was a clinically relevant resistance phenotype.

205 ***Molecular signature associated with amodiaquine resistance***

206 In the expanded dataset of 97 clinical isolates, median AQSA parasite survival was 8.0% (IQR
207 1.0–50.2), and 28.9% (28/97) had $\geq 45\%$ parasite survival. Ninety-six isolates were *K13*(C580Y) and
208 one was *K13*(Y493H). One isolate had *Pfmdr1* amplification. *Pfpm2* amplification was present in
209 78.4% (76/97) of isolates. There was no significant difference in the median AQSA value of strains
210 with single-copy *Pfpm2* (6.3% [IQR 1.1–56.4]) versus those with multiple copies (12.3% [IQR 0.91–
211 47.6]) ($P = 0.74$, Mann–Whitney).

212

213 The frequency of SNPs for the key *P. falciparum* resistance genes *Pfcr*t and *Pfmdr1* are shown in
214 Figure 5. For *Pfcr*t, two haplotypes coding positions 72–76 were confirmed (mutations underlined):
215 CVIET (99.0%; 96/97) and CVIDT (1.0%; 1/97). For isolates with complete *Pfcr*t haplotypes ($N = 94$),
216 12 different haplotypes were identified, of which 97.9% (92/94) were either Dd2 or on the Dd2
217 background (Table 2). For *Pfmdr1*, six different haplotypes were found, with Y184F being the most
218 common (45.7% [43/94]) and 51.1% (48/94) having Y148F plus at least one other mutation (Table 2).

219

220 AQSA results for isolates with complete *Pfcr*t–*Pfmdr1* sequences ($N = 92$) indicated significant
221 differences in survival between four haplotypes: Dd2–Y184F/S784L/R945P versus Dd2 F145I–Y184F
222 and versus Dd2 G353V–Y184F ($P = 0.0075$ and $P = 0.0003$, respectively; Kruskal–Wallis); and
223 between Dd2 T93S–Y184F/F1068L versus Dd2 F145I–Y184F and versus Dd2 G353V–Y184F ($P =$
224 0.0003 and $P < 0.0001$, respectively; Kruskal–Wallis) (Figure 6A). When examining clinical outcomes,
225 although the data set was smaller ($N=60$), there was still a significant difference between Dd2
226 G353V–Y184F versus Dd2–Y184F/S784L/R945P or Dd2 T93S–Y184F/F1068L ($P = 0.0004$ and $P =$
227 0.0304 , respectively; log-rank Mantel–Cox) (Figure 6B).

228 Discussion

229 Antimalarial drug resistance in Cambodia has curtailed the efficacy of deployed ACTs. Recently, the
230 emergence of triple mutants with resistance to artemisinin, piperaquine and mefloquine underlines
231 the need to find new options for uncomplicated malaria in the region [22-24]. Artesunate-
232 amodiaquine efficacy in Africa and Viet Nam and the lack of known amodiaquine resistance markers
233 in Cambodia suggested that this ACT would be efficacious. Surprisingly, the treatment failure rate
234 was 19.0%; sufficient to exclude artesunate-amodiaquine as a treatment for uncomplicated malaria
235 in Cambodia.

236

237 The *K13*(C580Y) artemisinin resistance marker was ubiquitous in this study and is the predominant
238 *K13* mutant in Cambodia [25]. Artemisinin resistance increases recrudescence probability only if
239 there is also partner drug resistance [4, 5]. Thus, the high recrudescence rate is most likely explained
240 by the presence of amodiaquine resistance. The *in vitro* findings support this conclusion.

241

242 Previous studies of amodiaquine monotherapy in Africa indicated a mono-desethyl-amodiaquine IC_{50}
243 resistance threshold of >60 nM [26]. However, in the current study of artesunate-amodiaquine, ROC
244 analysis indicated a threshold of >180 nM. This discrepancy occurs because artemisinin resistance is
245 partial and parasite biomass following artesunate exposure will be low. Thus, a higher degree of
246 amodiaquine resistance is necessary to support parasite recrudescence following artesunate-
247 amodiaquine versus amodiaquine monotherapy. IC_{50} lacked sufficient discriminatory power to
248 differentiate between ACPR and recrudescence. This lack of correlation between IC_{50} and clinical
249 outcome has been observed for both artemisinin and piperaquine, promoting the development of
250 more pharmacologically relevant assays based on parasite survival [4, 21]. Survival assays measure
251 cytotoxic activity, and are a stringent test of antimalarial activity [27]. In this study, we developed a
252 novel parasite survival assay for amodiaquine, the AQSA. This correlated well with clinical outcome,
253 and was sufficiently sensitive and specific to use as a resistance phenotype to investigate potential

254 amodiaquine resistance molecular markers. Consequently, we propose AQSA $\geq 45\%$ parasite survival
255 as a novel definition for amodiaquine resistance.

256

257 In Africa, selection of *Pfmdr1* N86 and D1246 following artemether-lumefantrine treatment
258 improves clinical outcomes with artesunate-amodiaquine [28]. This suggests that an artemether-
259 lumefantrine-amodiaquine triple therapy could counter-select for resistance, and initiatives to
260 develop the combination are ongoing [29]. However, the rationale for artesunate-amodiaquine-
261 lumefantrine in Cambodia has not been demonstrated. Our data show amodiaquine resistance exists
262 in Cambodia in the absence of the African amodiaquine-resistant haplotype *Pfmdr1* 86Y/Y184/1246Y
263 [10], as all mutant *Pfmdr1* haplotypes were N86/184F/D1246. Also, mutations common in South
264 American *P. falciparum* *Pfmdr1* (S1034C, N1042D and D1246Y) were absent. Molecular markers for
265 lumefantrine resistance are not validated for South East Asia and our data do not support counter
266 selection. Rather, resistance to both amodiaquine and lumefantrine appears possible in Cambodian
267 *P. falciparum*.

268

269 In the expanded parasite data set, all except two *Pfcrtr* haplotypes were on the Dd2 background (i.e.
270 C72/V73/74I/75E/76T/220S/271E/326S/356T/371I). The amodiaquine-resistant 72–76 SVMNT
271 haplotype reported in South American parasites was absent, consistent with previous data [10].
272 In Asia, novel *Pfcrtr* mutations have emerged on the Dd2 chloroquine-resistant allelic background, in
273 contrast to Africa where 3D7, GB4 and Cam783 haplotypes predominate [30]. In clinical isolates and
274 gene edited parasites, *Pfcrtr* Dd2 decreases *in vitro* susceptibility to amodiaquine relative to *Pfcrtr*
275 3D7, so can be considered an amodiaquine-tolerant background [30, 31]. In the current study, 85.9%
276 (79/92) of the Dd2-based haplotypes had additional mutations. The *Pfcrtr* mutations G353V and
277 F145I were significantly associated with amodiaquine sensitivity in the AQSA and G353V was
278 associated with ACPR. These findings are consistent with data in gene-edited parasites showing that
279 these mutations confer resistance to piperazine, but sensitize parasites to amodiaquine,

280 chloroquine and quinine [32, 33]. Notably, in gene edited parasites neither G353V nor F145I had any
281 impact on lumefantrine susceptibility and counter selection between lumefantrine and amodiaquine
282 appears unlikely [32]. *Pfcr*t T93S is associated with piperazine resistance and its prevalence has
283 been increasing in Cambodia [33-35]. In the current study, *Pfcr*t T93S was the most common *Pfcr*t
284 haplotype, and was associated with both amodiaquine-susceptible and amodiaquine-resistant
285 haplotypes. Thus, there was no association of elevated AQSA with an identified polymorphism in
286 *Pfcr*t. Rather, key mutations in this gene appear to be associated with sensitization to amodiaquine.
287
288 *Pfmdr*1 showed six haplotypes in this study, and 51.1% (48/94) were Y184F plus another mutation.
289 Of these, S784L/R945P and F1068L were associated with clinical and *in vitro* resistance. *Pfmdr*1
290 S784L has previously been noted from several locations in Cambodia at frequencies between 0.5–
291 29.8%, but was not associated with R945P [10]. *Pfmdr*1 F1068L was reported from Pailin at a low
292 frequency (4.2%) [10], versus 20.2% (19/94) in the current study. This study is the first report
293 associating these *Pfmdr*1 haplotypes with amodiaquine resistance. However, their causality remains
294 to be demonstrated by extended genome-wide association studies and genome editing. Of interest,
295 the single amodiaquine-susceptible *Pfmdr*1 S784L/R945P mutant in the AQSA was the only isolate
296 with *Pfmdr*1 amplification. Conclusions cannot be drawn from one isolate, but additional
297 investigations regarding this observation may be valuable. Excluding this isolate from the analysis
298 does not affect the conclusions, though statistical significance is increased (Dd2–Y184F/S784L/R945P
299 versus Dd2 F145I–Y184F: $P = 0.0020$; Dd2–Y184F/S784L/R945P versus Dd2 G353V–Y184F: $P <$
300 0.0001; log-rank Mantel–Cox).

301

302 The origin of amodiaquine resistance in Cambodia is unclear. This drug was not used recently and
303 saw only a limited implementation in the 1990s. Piperazine resistance selection is unlikely to be
304 associated with an emergence of amodiaquine resistance as the associated genotype i.e. *Pfpm*2
305 amplification and *Pfcr*t mutations have either no effect or sensitize parasites to amodiaquine [32].

306 We could thus hypothesize that amodiaquine resistance emerged in Cambodia in the past
307 consecutively to extensive chloroquine use.

308

309 While confirming artesunate-amodiaquine resistance in Cambodia, this was a small study conducted
310 in a limited geographical region. Although we saw significant relationships between SNPs in key
311 resistance genes and amodiaquine resistance phenotypes it was not possible to determine causality.
312 For example, these associations could be the consequence of the close relatedness of many of the
313 parasites in this study. Further investigations are, therefore, required to confirm the putative
314 amodiaquine resistance markers and assess their relevance to other malaria endemic areas. In the
315 absence of molecular markers, the AQSA provides a novel methodology to assess clinically relevant
316 amodiaquine resistance. However, the AQSA resistance phenotype of $\geq 45\%$ parasite survival was
317 determined according to the study size and location and may require revision with additional data.

318

319 This study highlights the need for careful assessment of therapeutic outcomes and molecular
320 markers before introducing a new antimalarial treatment in Cambodia. Resistance to amodiaquine
321 was unexpected and was not associated with any known resistance genotype from other malaria
322 endemic areas. Our findings indicate that clinical resistance was linked to the acquisition of high-
323 level resistance against an amodiaquine-tolerant background. Thus, any amodiaquine-based
324 combination would place partner compounds under a high selective pressure and be inappropriate
325 in Cambodia.

326 **Notes**

327 **Funding**

328 This work was supported by the Bill & Melinda Gates Foundation and USAID-PMI through the World
329 Health Organization. MMK & BW were supported by 5% initiative (MIVS-ACT, grant #15SANIN211).
330 The funding source was not involved in the design and conduct of the study, the interpretation of
331 the results and the development of this publication. The funders of this study had no role in study
332 design, data collection, data analysis, data interpretation, writing of the report, and the decision to
333 submit. The corresponding author had full access to all data in the study and final responsibility for
334 the decision to submit for publication.

335

336 **Acknowledgements**

337 Naomi Richardson of Magenta Communications Ltd developed a first draft of this article from the
338 statistical output, collated author contributions and provided graphic services and was funded by the
339 World Health Organization.

340

341 **Contributions**

342 RL, PR, FA & BW contributed to the concept and design of the study. MMK, CM, NK, SK, SKe, CK, NKI,
343 RE, SC & BI were involved in data acquisition and MMK, RL, CM, NK, DMB, MDB, PR, FA & BW in data
344 analysis and interpretation. All authors critically reviewed the manuscript, approved the final version
345 and take full responsibility for the publication.

346

347 **Declaration of interests**

348 MDB, DMB and PR are a staff member of the World Health Organization. The authors alone are
349 responsible for the views expressed in this publication and they do not necessarily represent the
350 decisions, policy or views of the World Health Organization. There are no other conflicts of interest
351 to report.

352

353 **References**

- 354 1. World Health Organization. World Malaria Report. **2018**. Available at:
355 <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>. Accessed 18
356 September 2019.
- 357 2. Noedl H, Se Y, Schaecher K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western
358 Cambodia. *N Engl J Med* **2008**; 359(24): 2619-20.
- 359 3. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant
360 *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet* **2013**; 45(6): 648-55.
- 361 4. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, et al. Novel phenotypic assays for the detection of
362 artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in-vitro* and *ex-vivo* drug-
363 response studies. *Lancet Infect Dis* **2013**; 13(12): 1043-9.
- 364 5. Witkowski B, Khim N, Chim P, et al. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium*
365 *falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57(2):
366 914-23.
- 367 6. Duru V, Witkowski B, Menard D. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin
368 derivatives and piperazine: A major challenge for malaria elimination in Cambodia. *Am J*
369 *Trop Med Hyg* **2016**; 95(6): 1228-38.
- 370 7. Rogers WO, Sem R, Tero T, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for
371 uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J* **2009**; 8: 10.
- 372 8. Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of
373 uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health* **2006**;
374 11(12): 1800-7.
- 375 9. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine
376 select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated
377 for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51(3): 991-7.

- 378 10. Srimuang K, Miotto O, Lim P, et al. Analysis of anti-malarial resistance markers in *pfmdr1* and
379 *pfcr1* across Southeast Asia in the Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration. *Malar J*
380 **2016**; 15(1): 541.
- 381 11. Oladipo OO, Wellington OA, Sutherland CJ. Persistence of chloroquine-resistant haplotypes
382 of *Plasmodium falciparum* in children with uncomplicated Malaria in Lagos, Nigeria, four
383 years after change of chloroquine as first-line antimalarial medicine. *Diagn Pathol* **2015**; 10:
384 41.
- 385 12. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate
386 *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat*
387 *Commun* **2016**; 7: 11553.
- 388 13. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*
389 malaria parasites conferred by *pfcr1* mutations. *Science* **2002**; 298(5591): 210-3.
- 390 14. Beshir K, Sutherland CJ, Merinopoulos I, et al. Amodiaquine resistance in *Plasmodium*
391 *falciparum* malaria in Afghanistan is associated with the *pfcr1* SVMNT allele at codons 72 to
392 76. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54(9): 3714-6.
- 393 15. Thanh NX, Trung TN, Phong NC, et al. Open label randomized comparison of
394 dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine for the treatment of
395 uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in central Vietnam. *Trop Med Int Health*
396 **2009**; 14(5): 504-11.
- 397 16. Thanh NX, Trung TN, Phong NC, et al. The efficacy and tolerability of artemisinin-piperaquine
398 (Artequick(R)) versus artesunate-amodiaquine (Coarsucam) for the treatment of
399 uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in south-central Vietnam. *Malar J* **2012**; 11:
400 217.
- 401 17. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. **2009**.
402 Available at:

- 403 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44048/9789241597531_eng.pdf;jsessionid=BF00D558415E9CB80B884CCBD6269BF7?sequence=1. Accessed 27 February 2019.
- 404
- 405 18. World Health Organization. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug
406 efficacy: genotyping to identify parasite populations. **2008**. Available at:
407 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596305/en/>. Accessed 26 February
408 2019.
- 409 19. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant
410 *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2014**; 505(7481): 50-5.
- 411 20. Witkowski B, Duru V, Khim N, et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium*
412 *falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* **2017**; 17(2):
413 174-83.
- 414 21. Duru V, Khim N, Leang R, et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine
415 failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates
416 in novel piperazine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med*
417 **2015**; 13: 305.
- 418 22. Rossi G, De Smet M, Khim N, Kindermans JM, Menard D. Emergence of *Plasmodium*
419 *falciparum* triple mutant in Cambodia. *Lancet Infect Dis* **2017**; 17(12): 1233.
- 420 23. Leang R, Khim N, Chea H, et al. Pyronaridine-artesunate plus single-dose primaquine efficacy
421 and safety for the treatment of malaria in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*
422 **2019**; 63(10): e01273-19.
- 423 24. Bui Quang P, Huynh Hong Q, Tran Thanh D, et al. Pyronaridine-artesunate efficacy and safety
424 in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in areas of artemisinin-resistant
425 *falciparum* in Viet Nam (2017-2018). *Clin Infect Dis* **2019**.
- 426 25. Kheang ST, Sovannaroeth S, Ek S, et al. Prevalence of K13 mutation and Day-3 positive
427 parasitaemia in artemisinin-resistant malaria endemic area of Cambodia: a cross-sectional
428 study. *Malar J* **2017**; 16(1): 372.

- 429 26. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXIV. Trends of *in*
430 *vitro* antimalarial drug responses in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 76(1):
431 20-6.
- 432 27. Paguio MF, Bogle KL, Roepe PD. *Plasmodium falciparum* resistance to cytotoxic versus
433 cytostatic effects of chloroquine. *Mol Biochem Parasitol* **2011**; 178(1-2): 1-6.
- 434 28. Okell LC, Reiter LM, Ebbe LS, et al. Emerging implications of policies on malaria treatment:
435 genetic changes in the *Pfmdr-1* gene affecting susceptibility to artemether-lumefantrine and
436 artesunate-amodiaquine in Africa. *BMJ Glob Health* **2018**; 3(5): e000999.
- 437 29. University of Oxford. A Trial to Compare the Efficacy, Safety and Tolerability of Combinations
438 of 3 Anti-malarial Drugs Against Combinations of 2 Anti-malarial Drugs (Asia) (DeTACT-ASIA).
439 **2019**. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03939104>. Accessed 5 December
440 2019.
- 441 30. Dhingra SK, Gabryszewski SJ, Small-Saunders JL, et al. Global spread of mutant PfCRT and its
442 pleiotropic impact on *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and fitness. *MBio* **2019**;
443 10(2).
- 444 31. Venkatesan M, Gadalla NB, Stepniewska K, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum*
445 chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors
446 that affect treatment outcomes for *P. falciparum* malaria after artemether-lumefantrine and
447 artesunate-amodiaquine. *Am J Trop Med Hyg* **2014**; 91(4): 833-43.
- 448 32. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, et al. Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer
449 *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperazine. *Nat Commun*
450 **2018**; 9(1): 3314.
- 451 33. Dhingra SK, Small-Saunders JL, Menard D, Fidock DA. *Plasmodium falciparum* resistance to
452 piperazine driven by PfCRT. *Lancet Infect Dis* **2019**; 19(11): 1168-9.
- 453 34. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, et al. Determinants of dihydroartemisinin-
454 piperazine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and

455 Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis* **2019**;
456 19(9): 952-61.

457 35. Hamilton WL, Amato R, van der Pluijm RW, et al. Evolution and expansion of multidrug-
458 resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *Lancet Infect Dis* **2019**;
459 19(9): 943-51.

460

461 **Figure legends**

462 Figure 1. Map of study locations in Cambodia.

463

464 Figure 2. Kaplan–Meier estimates of ACPR with artesunate-amodiaquine for uncomplicated malaria.

465 There were no re-infections on PCR-adjustment and no patients were censored.

466

467 Figure 3. *In vitro* susceptibility of 63 *P. falciparum* clinical isolates to mono-desethyl-amodiaquine
468 determined in the [³H]-hypoxanthine uptake inhibition assay.

469 A) Relationship between mono-desethyl-amodiaquine IC₅₀ and clinical outcome at Day 28 following
470 treatment with artesunate-amodiaquine. Open circles represent *P. falciparum* isolates and black
471 horizontal bars and I bars indicate the median and interquartile range, statistical comparison used
472 the Mann–Whitney test.

473 B) Receiver-operating characteristic curve for IC₅₀ versus clinical outcome at Day 28.

474

475 Figure 4. Parasite survival in the amodiaquine survival assay (AQSA).

476 A) Correlation between AQSA parasite survival and IC₅₀ determined in the [³H]-hypoxanthine uptake
477 inhibition assay.

478 B) Relationship between AQSA parasite survival and clinical outcome at Day 28 following treatment
479 with artesunate-amodiaquine. Open circles represent *P. falciparum* isolates and black horizontal
480 bars and I bars indicate the median and interquartile range, statistical comparison used the Mann–
481 Whitney U test.

482 C) Receiver-operating characteristic curve for AQSA parasite survival versus clinical outcome at Day
483 28 following treatment with artesunate-amodiaquine.

484 D) Kaplan–Meier estimates of ACPR for parasites with the AQSA resistance phenotype (≥45%
485 survival) versus those with the susceptible phenotype (<45% survival), statistical comparison used
486 the log-rank test (Mantel–Cox).

487

488 Figure 5. Prevalence of mutations in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 in Cambodian *P. falciparum* clinical isolates
489 (N=97).

490

491 Figure 6. Effect of *P. falciparum* *Pfcr*t–*Pfmdr*1 haplotype on resistance phenotype.

492 A) Parasite survival in the amodiaquine survival assay (AQSA) for Cambodian clinical isolates (N = 92),
493 the horizontal red dotted line indicates the AQSA resistance phenotype ($\geq 45\%$ parasite survival).

494 Symbols represent *P. falciparum* isolates and black horizontal bars and I bars indicate the median
495 and interquartile range, statistical comparison used the Kruskal–Wallis test.

496 B) Kaplan–Meier plots for Day-28 ACPR in 60 patients with *P. falciparum* malaria treated with
497 artesunate-amodiaquine for amodiaquine-resistant and -susceptible *Pfcr*t–*Pfmdr*1 haplotypes.

498 **Table 1. Baseline characteristics of the safety and efficacy population.**

Characteristic	Study population (N=63)
Males/females, n	61/2
Adults aged >15 years, n	56
Children aged 5–15 years, n	7
Mean age (SD) [range], years	28.2 (11.9) [5–56]
Mean weight (SD) [range], kg	53.7 (10.5) [23–78]
Geometric mean parasitemia (range) μL^{-1} blood	22,695 (1,756–248,000)

499 SD, standard deviation

500

501 **Table 2. *Pfcr* or *Pfmdr1* haplotype and parasite survival in the amodiaquine survival assay (AQSA).**

Haplotype	n (%)	Median parasite survival, % (IQR)
<i>Pfcr</i>		
N = 94		
Dd2†	13 (13.8)	48.1 (1.5–77.2)
Dd2 F145I	7 (7.4)	0.0 (0–1.8)
Dd2 G353V	13 (13.8)	0.4 (0–1.0)
Dd2 G367C	1 (1.1)	0.4
Dd2 H97Y	14 (14.9)	15.9 (4.5–46.8)
Dd2 I210F	13 (13.8)	8.0 (3.8–31.5)
Dd2 I218F	1 (1.1)	0.0
Dd2 M343I	2 (2.1)	1.6 (0.2–3.0)
Dd2 N88K	1 (1.1)	0.7
Dd2 T93S	27 (28.7)	57.8 (22.6–71.7)
Cam734†	1 (1.1)	11.1
GB4†	1 (1.1)	0.0
<i>Pfmdr1</i>		
N = 94		
Wild type	3 (3.2)	4.8 (1.4–11.1)
Y184F	43 (45.7)	1.3 (0–6.3)
P72S/Y184F	3 (3.2)	24.7 (0.6–32.9)
Y184F/F1068L	19 (20.2)	64.2 (46.0–74.7)
Y184F/G1314D	18 (19.1)	13.7 (3.6–42.8)
Y184F/S784L/R945P	8 (8.5)	67.8 (48.1–81.6)

502 †Mutations for *Pfcr* D2d: M74I/N75E/K76T/A220S/Q271E/N326S/I356T/R371I; *Pfcr* Cam734:

503 M74I/N75D/K76T/A220S/Q271E/T333S; *Pfcr* GB4: 74I/75E/76T/A220S/Q271E/R371I.

504 *Pfcr*, *P. falciparum* chloroquine resistance transporter; *Pfmdr1*, *P. falciparum* multidrug resistance 1.

Figure 1

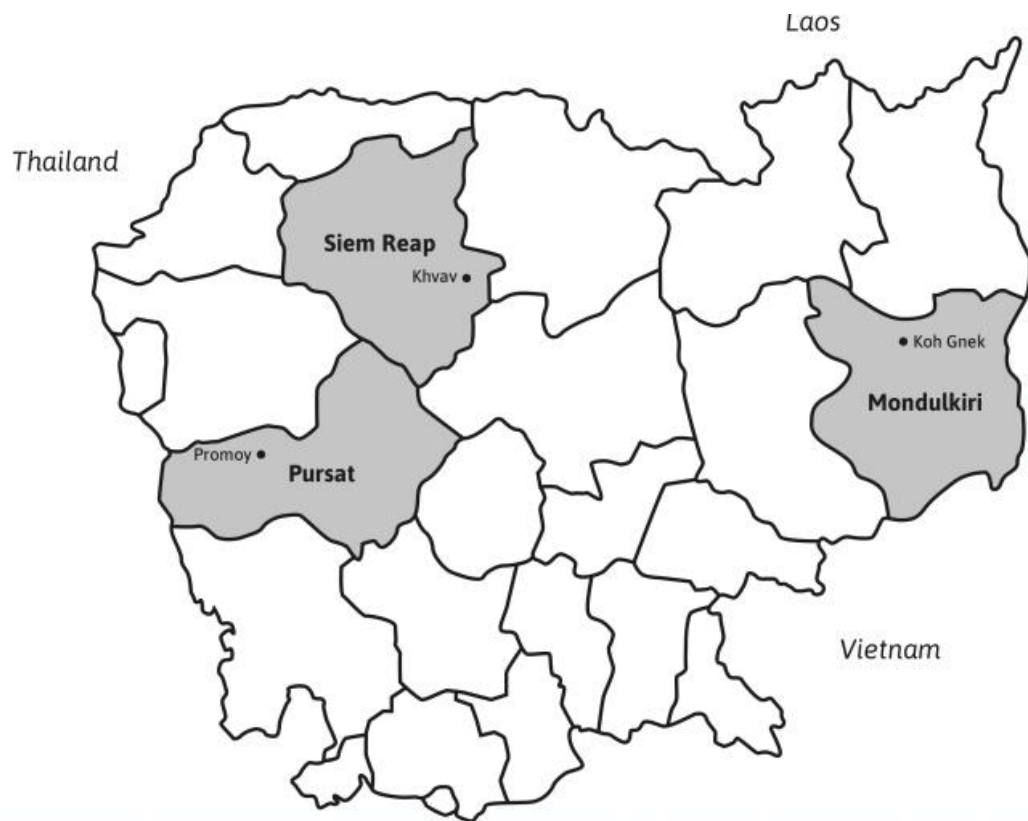


Figure 2

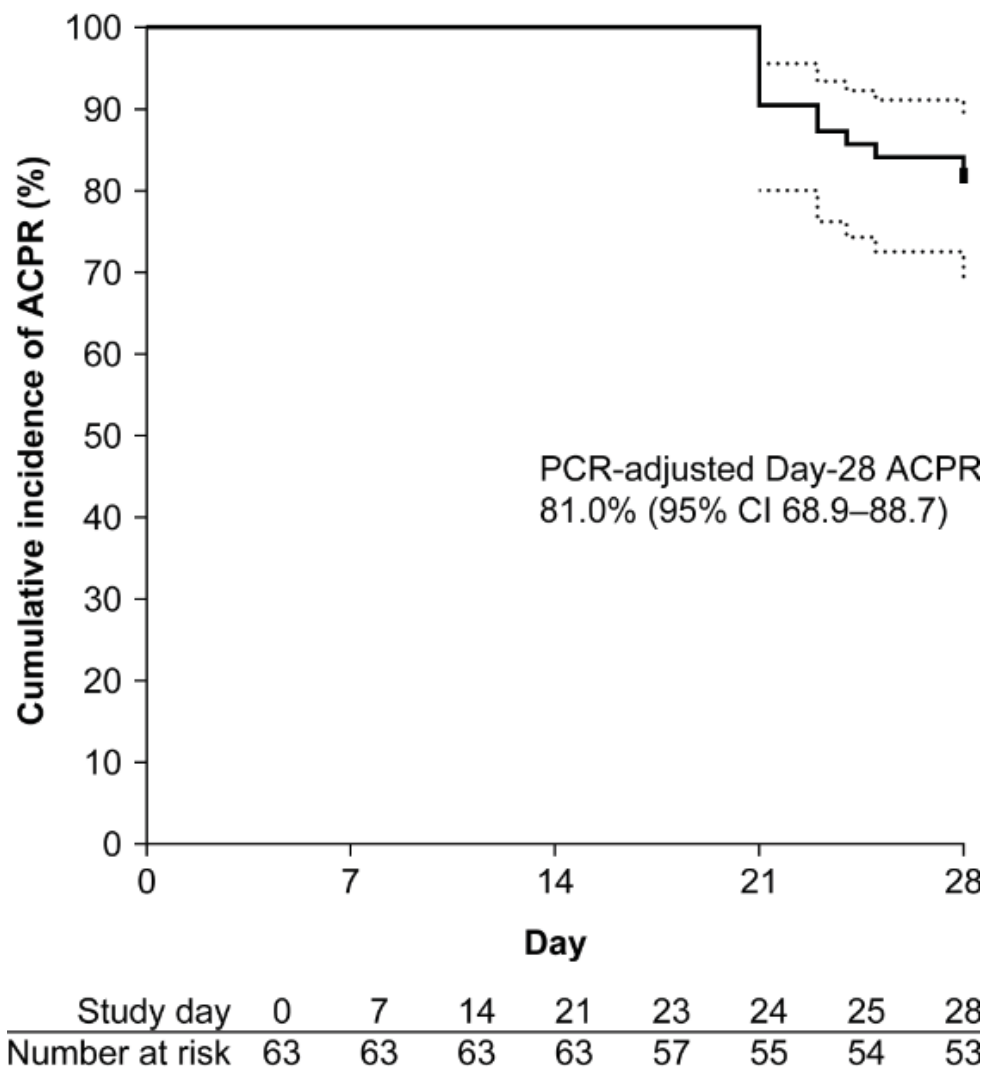


Figure 3

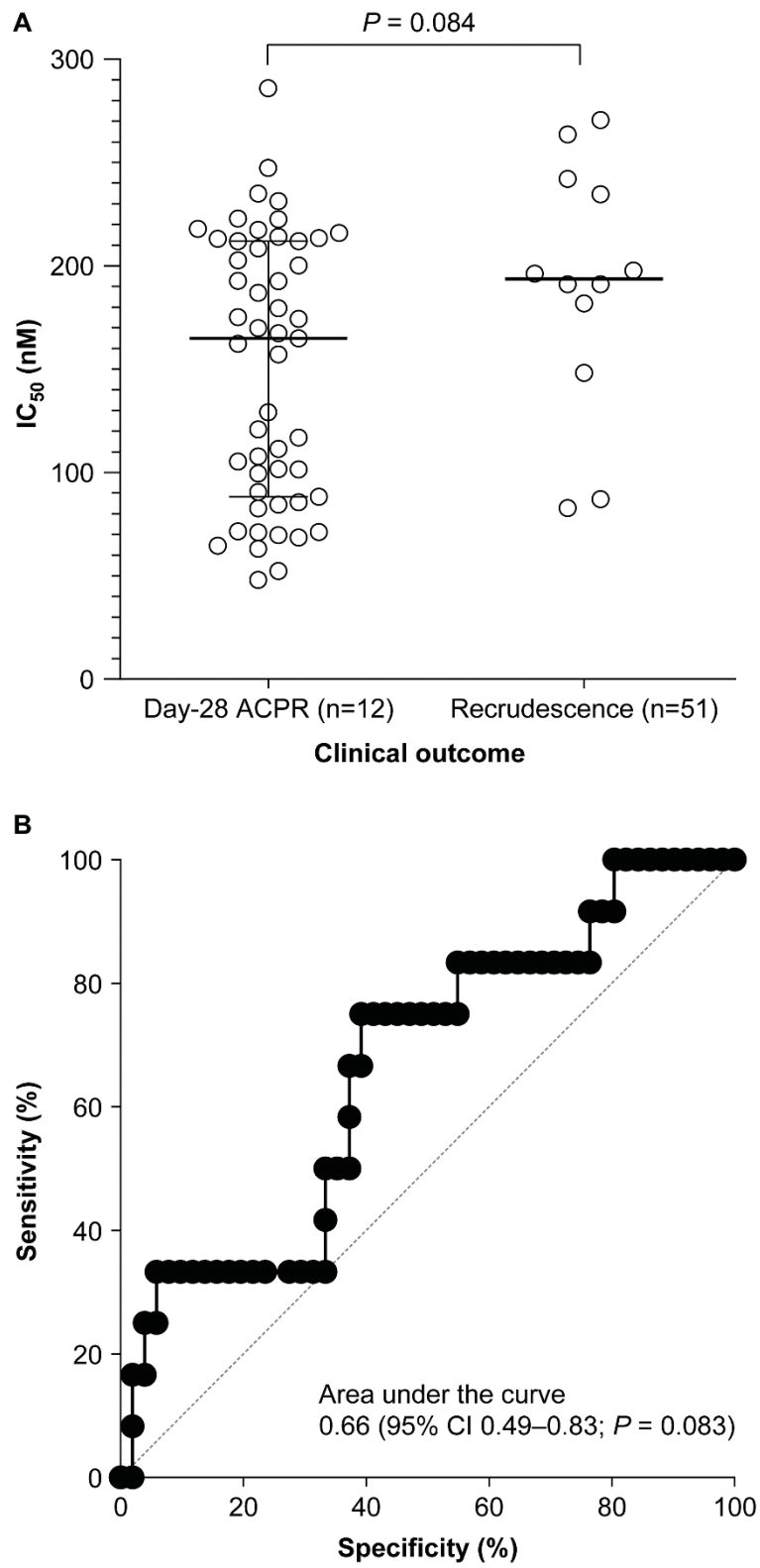


Figure 4

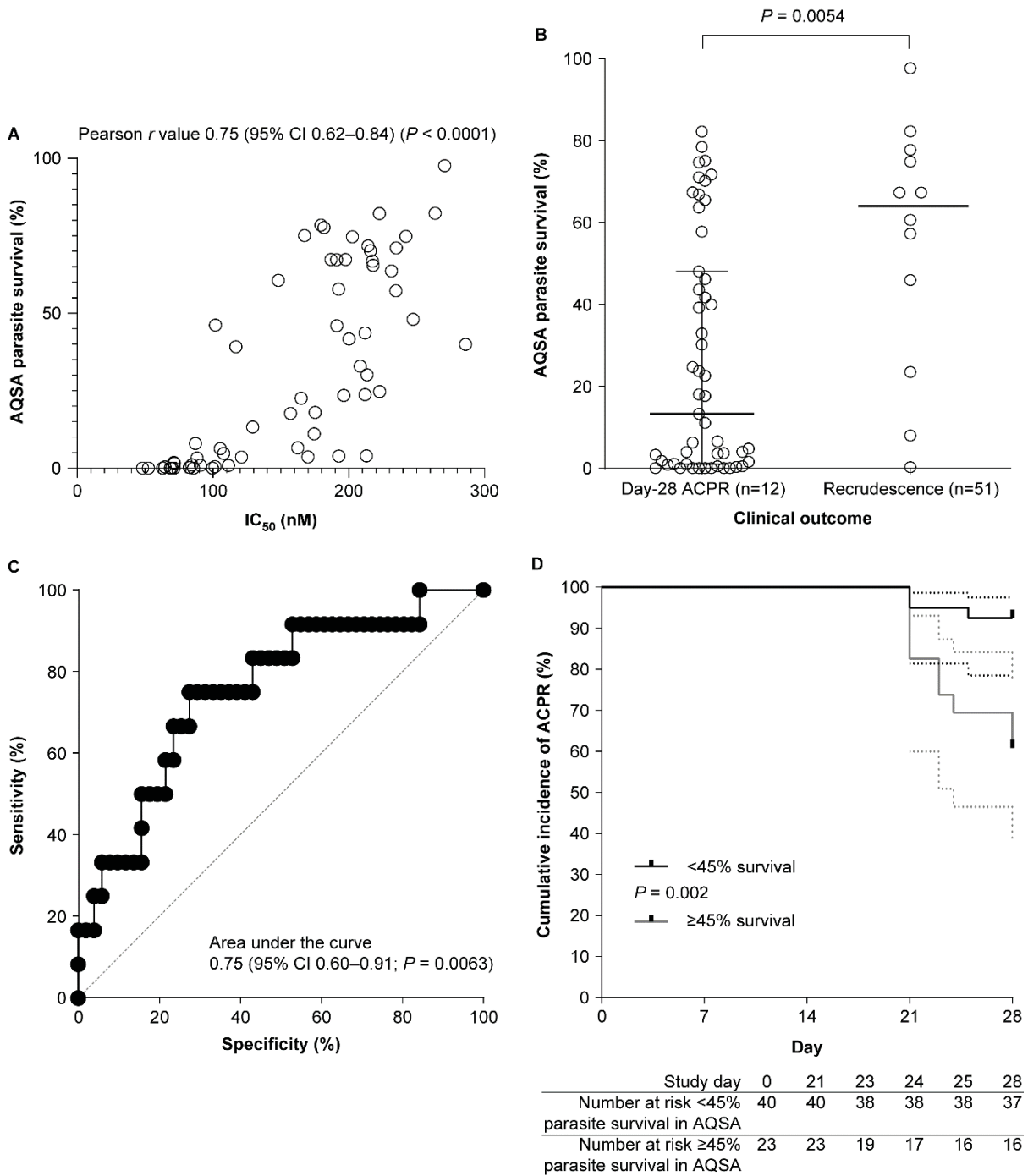


Figure 5

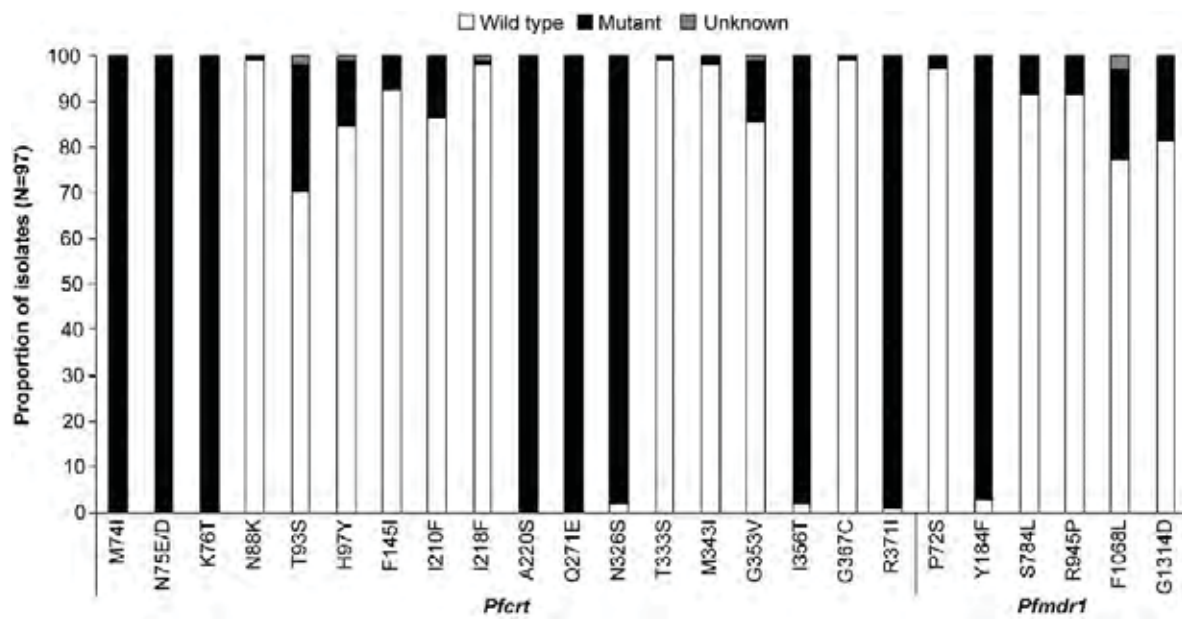
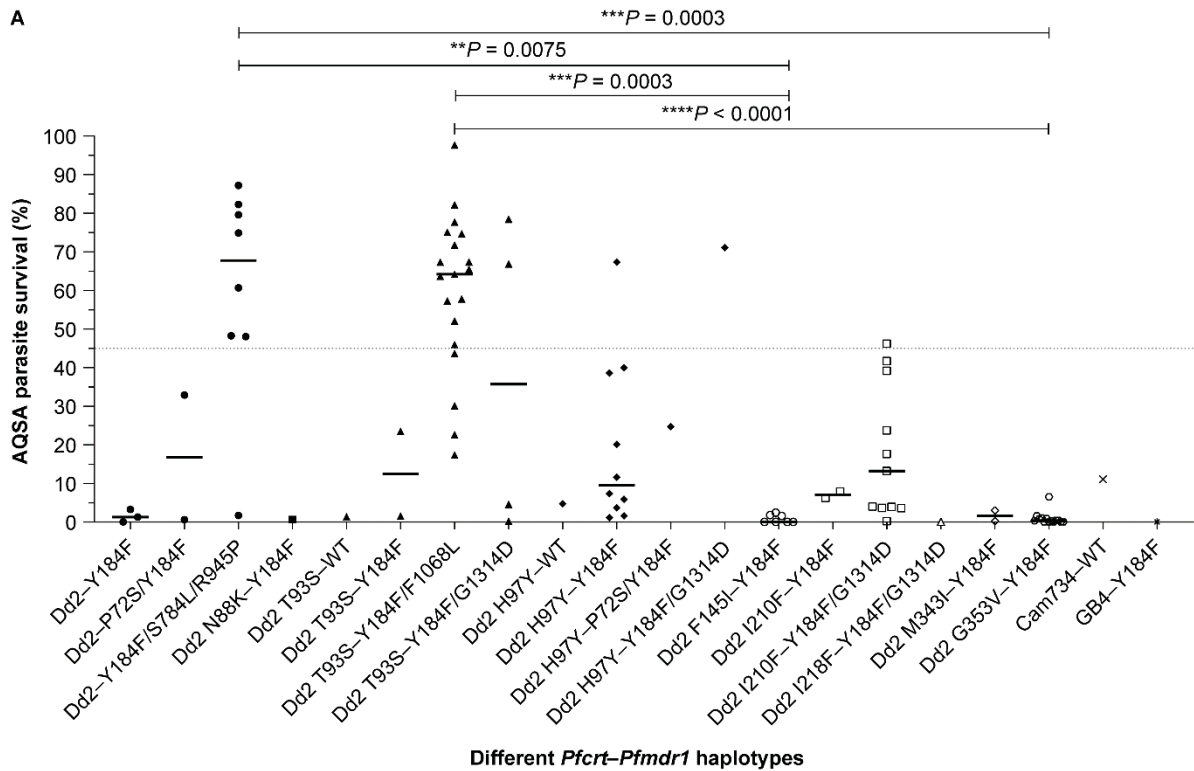
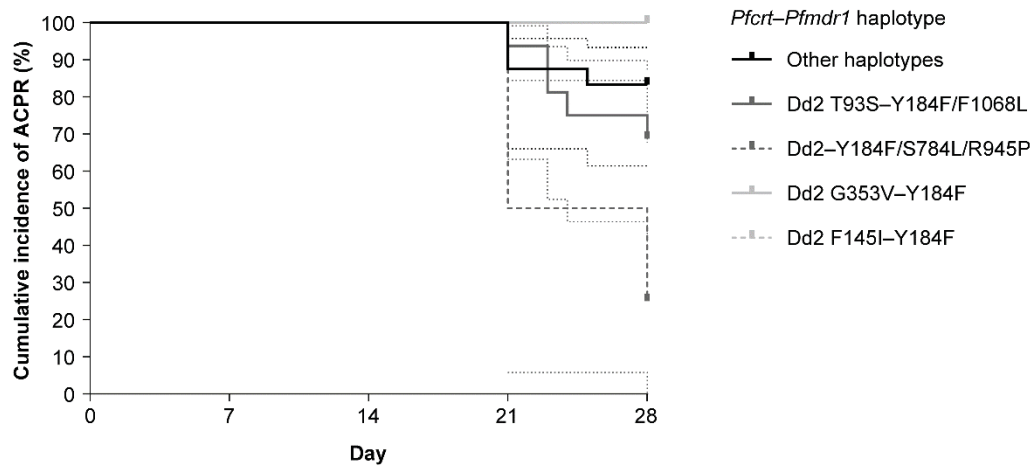


Figure 6



B Significant differences:
Other haplotypes versus Dd2-Y184F/S784L/R945P: $P = 0.0108$
Dd2 T93S-Y184F/F1068L versus Dd2 G353V-Y184F: $P = 0.0304$
Dd2-Y184F/S784L/R945P versus Dd2 G353V-Y184F: $P = 0.0004$



Study day	0	21	23	24	25	28
Number at risk other haplotypes	24	24	21	21	21	20
Number at risk Dd2 T93S-Y184F/F1068L	16	16	15	13	12	12
Number at risk Dd2-Y184F/S784L/R945P	4	4	2	2	2	2
Number at risk Dd2 G353V-Y184F	13	13	13	13	13	13
Number at risk Dd2 F145I-Y184F	3	3	3	3	3	3

III. ÉTUDE DU MÉCANISME DE RÉSISTANCE A L'ARTÉMISININE

1. Introduction

La découverte de l'ART, récompensée par le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2015, a été l'avancée majeure réalisée au cours du XX^{ème} siècle pour la lutte contre le paludisme. Les CTA ont participé à réduire la prévalence mondiale du paludisme de 37% entre 2010 et 2015 (269). Bien qu'ayant une demi-vie très courte, l'ART et ses nombreux dérivés semi-synthétiques sont extrêmement actifs (rapidité d'action et dose), en faisant la classe d'antipaludique majeure de l'arsenal chimio-thérapeutique.

L'émergence de souches résistantes à l'ART à la frontière Thaïlande/Cambodge en 2006 (43), et leur diffusion en Asie du Sud-Est (45) représentent cependant une menace pour l'élimination du paludisme. Aucune autre molécule n'est à l'heure actuelle en mesure de remplacer l'ART dans le cas où la résistance viendrait à diffuser massivement, notamment en Afrique.

Le mécanisme de résistance à l'ART a largement été exploré au cours des dix dernières années. Certains polymorphismes dans le gène *K13* ont été associés avec la résistance à l'ART d'isolats collectés en Asie du Sud Est (caractérisée par un retard de clairance et une augmentation des échecs thérapeutiques) (120,121). Les mécanismes biologiques impliqués dans cette résistance sont complexes. Il est admis que les parasites résistants à l'ART ont la capacité de mettre leur métabolisme en dormance au stade très jeune ring pour déjouer l'action de l'ART (118,126). Ils présentent aussi une capacité de réponse et de réparation améliorée face au stress oxydatif et à l'alkylation générés par l'ART (123,124). Plus récemment, il a été montré que l'import d'hémoglobine au sein des parasites résistants était diminué afin de minimiser l'activation de l'ART (135,136).

Tous ces mécanismes ont été en partie associés au gène *K13*, mais font nécessairement intervenir d'autres acteurs (129,132,133). La résistance à l'ART a en effet déjà été observée en l'absence de mutation dans le gène *K13* (140). De plus, pour une même mutation dans ce gène, les niveaux de résistance observés par RSA variaient considérablement (120,121). Enfin, plusieurs études

transcriptomiques ont mis en évidence une régulation complexe de nombreux gènes au sein des parasites résistants à l'ART (124,126,270). Le rôle de ces différents acteurs dans la résistance n'a cependant jamais été précisé et ces gènes ne sont pas utilisés pour la surveillance de la résistance à l'ART (120,139,270).

Cette partie vise à comprendre les mécanismes indépendants ou additionnels au gène *K13*, impliqués dans la résistance à l'ART.

Le phénotype de résistance d'échantillons *K13*-sauvages collectés au Cambodge a d'abord été évalué par RSA^{0-3h} afin de déterminer si une sélection de souches ART-résistantes pouvait être observée au Cambodge indépendamment de *K13*. En parallèle, un isolat *K13*-C580Y fraîchement collecté a été adapté en culture pendant 8 mois en l'absence d'ART, puis remis sous pressions successives d'ART. L'évolution de la susceptibilité de cette souche à l'ART a été mesurée tout au long du cycle dérive/culture pendant plus d'un an. Les transcrits de la souche initiale (isolat non adapté en culture), de la souche à la fin de la période de dérive, et de la souche à la fin de la période de pression ont ensuite été comparés par « Single Cell RNA sequencing » (en collaboration avec les Dr. Anthony RUBERTO & Anthony BOUILLON, Institut Pasteur de Paris). La combinaison de la culture au long terme et de l'étude transcriptomique pourrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la résistance à l'ART. Cette étude est en cours et les résultats présentés notamment sur l'analyse transcriptomique sont préliminaires.

2. Méthodes

a) Évaluation de la sensibilité à l'ART des isolats *K13*-sauvages

Les échantillons sanguins de patients infectés par *P. falciparum* ont été prélevés dans le cadre de différentes études d'efficacité thérapeutique réalisées au Cambodge entre 2012 et 2019 et cryopréservés. La région codant pour le domaine hélice du gène *K13* a été séquencée par méthode Sanger, comme précédemment décrit (120). Les échantillons présentant un génotype *K13*-sauvage ont été rétrospectivement décongelés et adaptés en culture selon la méthode précédemment décrite

(116). La susceptibilité de ces échantillons à l'ART a été déterminée par RSA^{0-3h} (116). Le pourcentage de survie parasitaire a été déterminé par ratio entre la parasitémie de l'échantillon exposé à la DHA rapportée à la parasitémie dans l'échantillon contrôle après 72h de culture. Un pourcentage de survie supérieur à 1% en RSA^{0-3h} a été le référentiel pour caractériser ces souches comme résistantes à l'ART.

b) Souche « initiale » *P. falciparum* utilisée pour la dérive en culture

Le sang du patient infecté a été prélevé le 13 mars 2017, à 25 jours après traitement avec la DHA-PPQ, correspondant à la date de l'échec thérapeutique. Le sang infecté a été reçu à l'Institut Pasteur du Cambodge (Phnom Penh) 24 heures après prélèvement. Une partie des parasites a directement été adaptée en culture (cet échantillon a été appelé « INITIAL »), et l'autre partie a été cryo-conservée dans de l'azote liquide. Le gène *K13* a été séquencé, et l'haplotype mutant C580Y a été confirmé. La souche a aussi été identifiée comme étant monoclonale.

c) Génération des souches « dérive » et « pression » par culture *in vitro*

L'isolat « INITIAL » a été maintenu en culture pendant 8 mois selon les méthodes standard précédemment décrites (116). Une fois par mois au cours de cette période, la susceptibilité de la souche à la DHA a été évaluée par RSA^{0-3h} (116). À chaque mesure, un échantillon sanguin a été conservé dans l'azote liquide. La souche parasitaire obtenue après les 8 mois de dérive en culture a été nommée « DÉRIVE ». Les parasites ont ensuite été maintenus en culture mais ont cette fois été exposés à 700 nM de DHA au moins une fois par mois pendant une période de 5 mois en suivant la méthode du RSA^{0-3h}. La souche exposée à la DHA a chaque fois été remise en culture après le test. La souche parasitaire obtenue après cette période de pression de DHA a été appelée "PRESSION".

d) Enrichissement des parasites au stade rings avec la Streptolysine O

Les souches INITIAL, DÉRIVE et PRESSION ont été rétrospectivement décongelées et adaptées en culture dans 800 µL de sang frais (fourni par la banque du sang de Phnom Penh). Après multiplication des parasites jusqu'à 5% de parasitémie, les trophozoïtes et les schizontes ont été éliminés par lyse osmotique avec 5% de D-sorbitol pour ne conserver que les stades rings. 36 heures après, les

schizontes ont été collectés en utilisant un gradient de densité de 75% de Percoll, et remis en culture pendant 3 heures avec 200 µL de sang frais pour obtenir les rings 0-3 heures post invasion (0-3h p.i). Les parasites ont ensuite été synchronisés au D-sorbitol 5% afin d'éliminer les schizontes restants, et lavés une fois avec du RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, Singapour). 800 unités de streptolysine O (SLO, Sigma-Aldrich, Singapour) ont ensuite été ajoutées à 200 µL de culot sanguin (la SLO a été activée avec 10mM de dithiothréitol (DTT) pendant deux heures à 37°C). La suspension a été maintenue six minutes à température ambiante sous agitation manuelle et lavée deux fois avec du RPMI 1640. Le culot obtenu après lyse contenait une grande majorité de globules rouges infectés par des rings 0-3h p.i, mais aussi quelques gamétocytes et fantômes de globules rouges. Un gradient de Percoll 75% a été par la suite réalisé pour éliminer les fantômes de membrane et les schizontes résiduels. Un frottis sanguin a été effectué pour évaluer l'enrichissement final.

e) Traitement des parasites enrichis à la DHA

Les rings 0-3h p.i enrichis des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION ont été exposés à 700 nM de DHA ou diméthylsulfoxyde (DMSO, solvant de la DHA utilisé comme témoin sans médicament) sans dilution préalable. Après 6 heures d'exposition, les parasites ont été lavés avec du RPMI et une suspension contenant environ 1000 globules rouges infectés/µL a été préparée dans du RPMI contenant 0,5% de BSA pour chaque condition. Cette suspension a été utilisée pour le tri cellulaire.

En parallèle, les parasites enrichis des souches INITIAL, DÉRIVE et PRESSION ont également été testés en RSA^{0-3h} en partant de 1% de parasitémie initiale (après dilution avec du sang frais). Les parasites ont été exposés au DMSO ou à 700 nM de DHA pendant 6 heures. Après lavage, les parasites ont été remis en culture dans un milieu complet pendant 66 heures. Le pourcentage de survie de chaque souche après exposition à la DHA a ensuite été évalué par énumération de 10000 globules rouges via un frottis sanguin coloré au Giemsa.

f) Préparation des bibliothèques « single cell » et séquençage des ARN

Avant le tri unicellulaire, les globules rouges ont été dilués à environ 1000 globules rouges/ μ L dans du RPMI 1640 contenant 0,5% de BSA afin de minimiser l'apparition de doublets. 12000 globules rouges ont ensuite été déposés sur une Puce B contenant des GEMs 10X V3 (Gel Beads-in-emulsion) et un master mix afin de générer des bibliothèques de cellules individuelles à code-barres. Pour minimiser la lyse de globules rouges par stress osmotique pendant le processus de tri (se faisant dans de l'eau pure), nous avons modifié le protocole par usage de RPMI 1640. Les bibliothèques cellulaires ont ensuite été préparées selon le protocole recommandé par 10X Genomics et séquencées à l'aide d'un séquenceur Illumina XTen (Macrogen, Corée du Sud).

g) Alignement, attribution des codes-barres, et qualité des transcrits

La qualité des séquences ARN obtenues a été confirmée en utilisant FASTQC (271). Les transcrits ont été pseudo-alignés aux transcrits de la souche 3D7 (PlasmoDB.org, version 44) grâce au logiciel Kallisto (v0.39.3), en utilisant les paramètres par défaut recommandés par le guide pour single-cell RNA-seq « kallisto bus » (<https://www.kallistobus.tools/>) (272). Les matrices comptées à partir des bibliothèques ont été analysées via R (v 3.6.0) pour des analyses plus poussées.

h) Filtre et normalisation

Afin de filtrer les cellules sans GEMs et d'obtenir seulement les séquences dérivées de rings, nous avons utilisé la fonction « emptyDrops » (273) avec un seuil de « fausse découverte » de 0,0001, et une taille de cellule minimum de 100 « identifiants moléculaires uniques » (UMIs). Les matrices énumérées ont été lues via Seurat (v3.1.0; <https://github.com/satijalab/seurat>), en excluant les gènes qui n'étaient pas exprimés dans au moins 0,5% du total des rings détectés dans chaque condition. Afin de déterminer le nombre de doublets, les rings présentant une déviation absolue de la médiane (MAD) >3 ont été exclus ainsi que les cellules avec un total de gènes uniques <2 MAD. Les matrices de données filtrées ont été combinées. Les combinaisons de données ont été normalisées via la fonction LogNormalize (Seurat). Le nombre de gènes compté pour chaque cellule a été divisé par le nombre

total de gènes, et multiplié par un facteur 1000. Ce nombre a ensuite été transformé en natural-log en utilisant \log_{1p} . Les caractéristiques hautement variables (HVs) ont été détectées en utilisant la fonction « FindVariableFeatures » avec le paramètre suivant : `selection.method = "vst"`, `nfeatures = 440`.

i) Réduction dimensionnelle et populations de rings

Après normalisation, l'échelle des données a été adaptée. Une analyse par réduction (« principal component analysis » (PCA) et « Uniform Manifold Approximation and Projection » (UMAP)) a été réalisée afin de faciliter la visualisation des différents groupes de gènes. Une approche non-supervisée a ensuite été utilisée pour identifier différents groupes de cellules. Un graphique « shared nearest neighbor » (SNN) a d'abord été construit en utilisant la fonction FindNeighbours (Seurat) avec les paramètres suivants : `reduction = "pca"`, `dims = 1:10`, `k = 20`. Après optimisation de la modularité du graphique SNN par l'algorithme Louvain, les différents groupes de cellules ont été identifiés via la fonction FindClusters (Seurat), avec une résolution de 0,3. À cette résolution, 6 groupes de cellules ont pu être identifiés. L'expression de gènes au sein de chaque groupe a ensuite été déterminée.

j) Analyse de l'expression différentielle de gènes

Afin de révéler les gènes enrichis dans chaque groupe, la fonction FindAllMarkers (Seurat) a été utilisée suivant les paramètres : `only.pos = F`, `min.pct = .50`, `logfc.threshold = 0.1`, `min.diff.pct = .1`, `test.use = "wilcox"`. Les gènes n'étant pas exprimés dans au moins 50% de toutes les cellules dans un groupe donné n'ont pas été considérés.

k) Enrichissement fonctionnel des mécanismes biologiques

Les gènes identifiés ont été entrés dans PlasmoDB. Une analyse de l'ontologie de gènes (GO) a été réalisée en utilisant les gènes différemment surexprimés ou sous-exprimés ($p.adjust < 0,05$). Les processus biologiques identifiés ont ensuite été téléchargés sur REVIGO (un outil bio-informatique en ligne qui liste l'ontologie de gènes) (274). Les termes redondants ont été supprimés. L'analyse du

réseau des processus biologiques a été visualisée à l'aide de la fonction « interactive graph » sur le site Web de REVIGO.

2. Résultats

a) Prévalence des isolats *K13*-sauvages au Cambodge de 2012 à 2019

La susceptibilité à l'ART de 134 isolats *K13*-sauvages collectés de 2012 à 2019 a été testée en RSA^{0-3h}. Les RSA ont été effectués deux fois pour chaque isolat trouvé résistant. Six échantillons présentaient un taux de survie supérieur à 1% (points rouges, figure 27), représentant 4,5% du total des échantillons *K13*-sauvages collectés de 2012 à 2019. La moyenne de survie des échantillons résistants était de 6,62% [1,65 – 25,33]. Les taux de survie moyens par année ont été comparés par test de Mann Whitney et aucune différence significative entre les groupes n'a été observée. Ces échantillons résistants ont été collectés dans les provinces de Kampong Thom (centre), Kampong Speu (Ouest), Mondulhiri, Ratanakiri et Stung Treng (Est). L'absence de mutation dans la région BTB-POZ du gène *K13* a aussi été confirmée pour les 6 échantillons *K13*-sauvages résistants à l'ART.

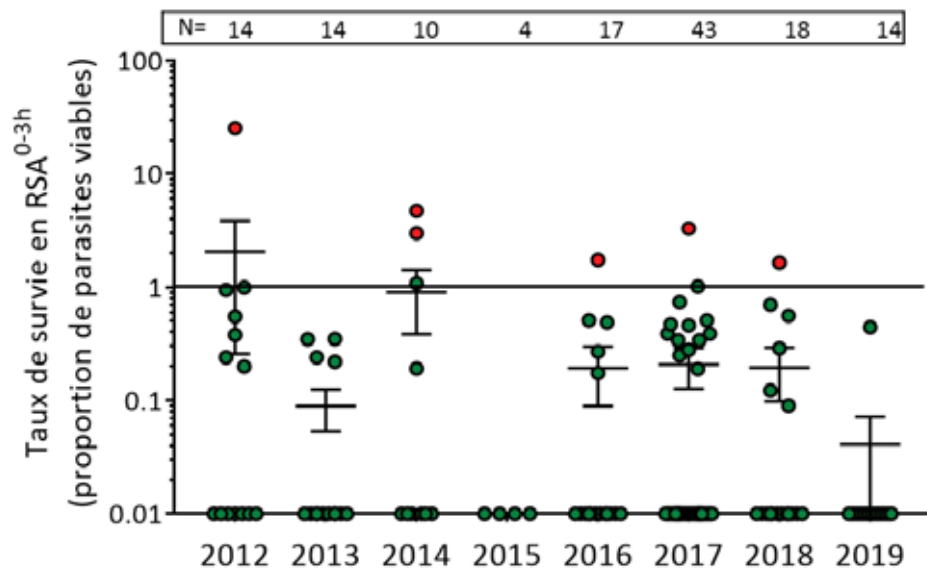


Figure 27 : Evolution de la susceptibilité des isolats *K13*-sauvages collectés au Cambodge de 2012 à 2019. Les points rouges sont les isolats considérés résistants à l'ART (seuil de résistance fixé à 1%). Les barres correspondent à la moyenne ainsi que l'écart type de la moyenne des pourcentages de survie pour chaque groupe.

b) Evolution de la susceptibilité à l'ART de l'isolat INITIAL au cours de la dérive en culture

La souche INITIALE correspond au premier RSA^{0-3h} effectué après adaptation de l'isolat frais prélevé du patient. L'échantillon INITIAL était K13-C580Y, monoclonal, et présentait un taux de survie en RSA de 37%.

L'échantillon DÉRIVE obtenu à la fin de la période d'adaptation de 242 jours sans exposition à la drogue présentait toujours la mutation K13-C580Y, mais présentait un taux de survie de 0,64% (inférieur au seuil de résistance à l'ART). La baisse de susceptibilité de la souche INITIALE à la DHA a été très rapide pendant les deux premiers mois de culture, puis plus lente ensuite.

Dès les premières expositions à 700 nM de DHA (à partir du jour 221), la tolérance de l'isolat à l'ART a augmenté jusqu'à atteindre 12% de survie après deux mois sous pressions médicamenteuses successives. Du jour 260 au jour 399 (dernier jour de culture), le taux de survie de la souche oscillait entre 10 et 15%. La susceptibilité à la DHA de la souche PRESSION (au dernier jour de culture) était de 11% en RSA (figure 28).

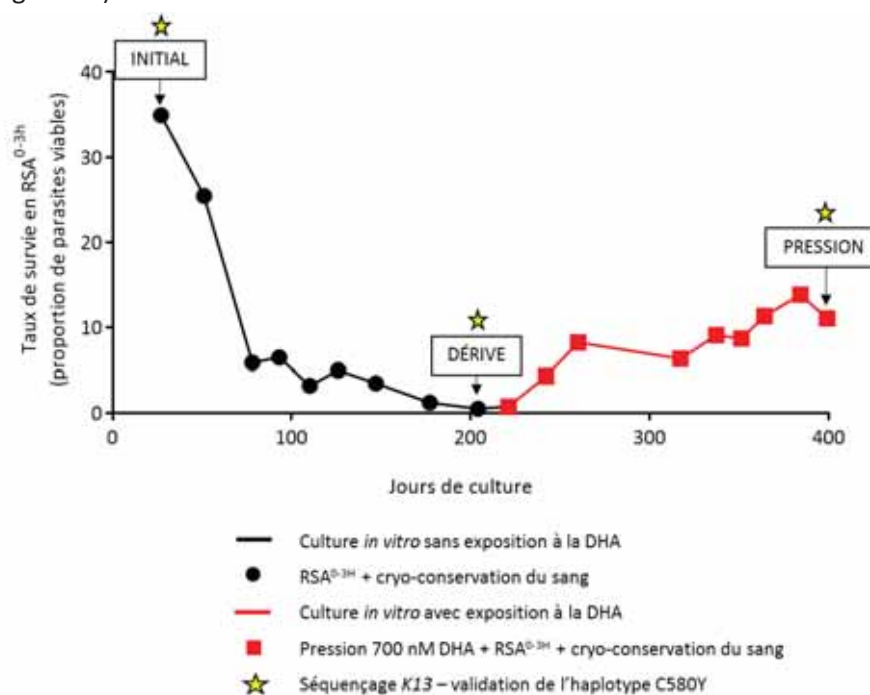


Figure 28 : Evolution de la susceptibilité de l'isolat INITIAL à l'ART pendant la dérive en culture. La souche INITIALE a été cultivée pendant 221 jours en l'absence de DHA (ligne noire), puis pendant 178 jours sous expositions répétées d'ART (700 nM de DHA pendant 6 heures), suivant le protocole du RSA^{0-3h} (ligne rouge). La présence de la mutation K13-C580Y a été vérifiée pour les souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION (étoile). L'évolution de la susceptibilité à la DHA a été mesurée environ tous les mois par RSA^{0-3h} au cours de la dérive en culture (points noirs) et de la mise sous pression (carrés rouges).

c) Enrichissement des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION au stade ring 0-3h p.i.

Une suspension de rings 0-3h p.i a été préparée pour les souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION ainsi que pour un isolat cambodgien contrôle *K13-sauvage*. Cette suspension a été enrichie en globules rouges infectés par lyse à la SLO. La parasitémie en ring 0-4h p.i obtenue après enrichissement pour la souche contrôle *K13-sauvage* était de 48%. Les parasitémies obtenues pour les souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION étaient respectivement de 42, 71 et 67% (figure 29). Quelques gamétocytes qui n'ont pas pu être éliminés au cours des différentes étapes d'enrichissement ont été observés dans chacune des cultures. Cependant, leur proportion était inférieure à 1%. La proportion de globules rouges infectés par plusieurs rings était d'environ 50% pour chaque condition.

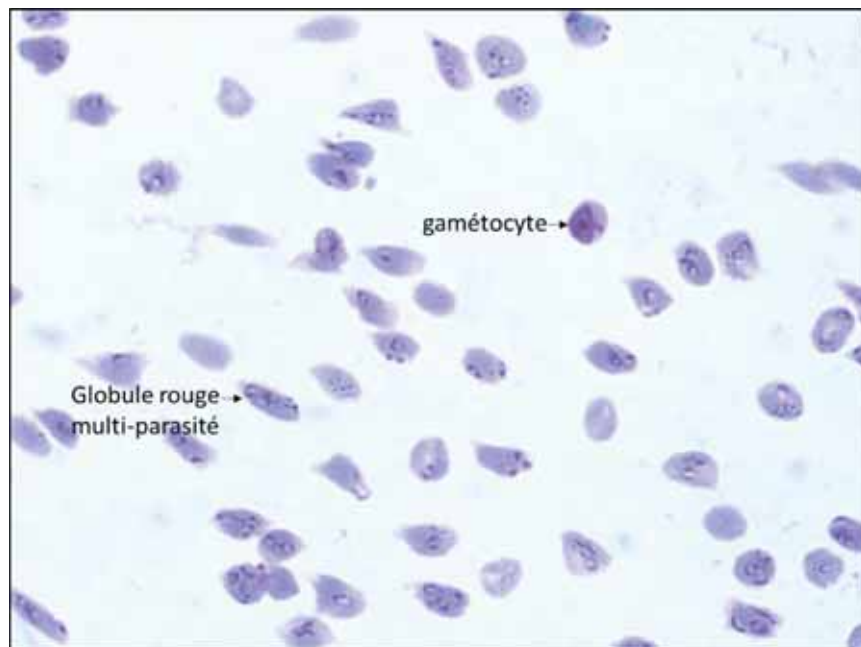


Figure 29 : souche PRESSION après enrichissement à la SLO.

d) Susceptibilité des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION après enrichissement

Les cultures obtenues ont été exposées à 700 nM de DHA ou DMSO pendant 6 heures, sans dilution préalable (figure 30). Afin d'évaluer l'impact des étapes d'enrichissement sur la susceptibilité des parasites à l'ART, un RSA^{0-3h} a été réalisé en parallèle pour chaque culture enrichie ajustée à 1% de parasitémie par ajout de globules rouges non-infectés. Les taux de survie des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION en RSA^{0-3h} étaient respectivement de 40%, 4,4% et 22,4%. Les taux de croissance (rapport

des parasitémies DMSO / avant exposition x100) des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION étaient respectivement de 3,58%, 3,53% et 7,15%.

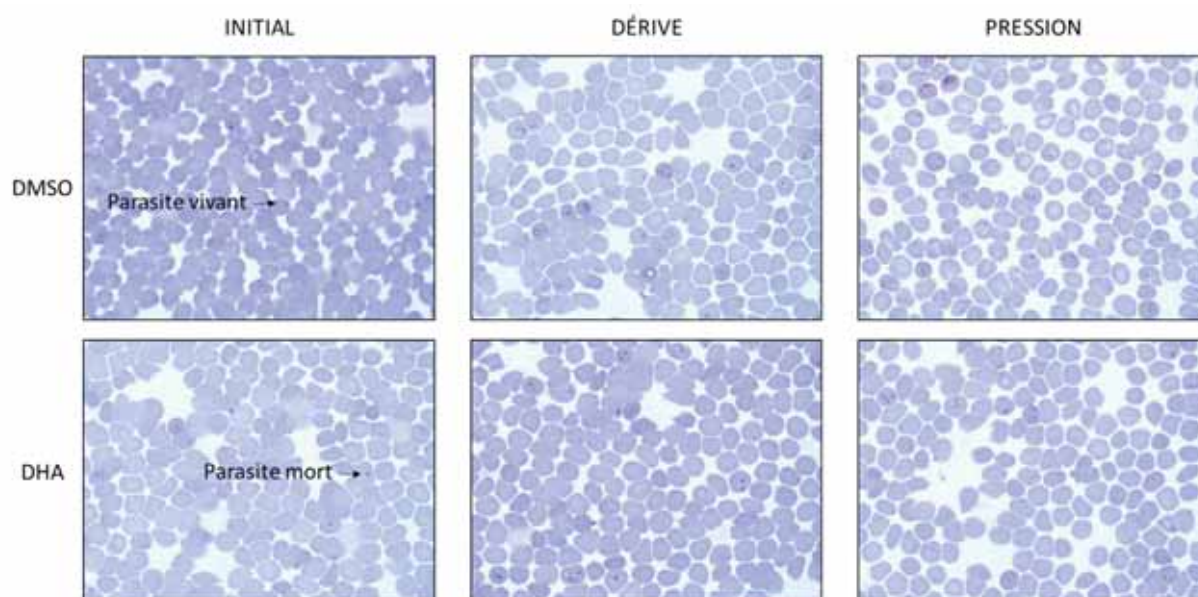


Figure 30 : Susceptibilité des parasites à la DHA après enrichissement, évaluée par RSA^{0-3h}.

Après 6 heures d'exposition à la DHA, une suspension cellulaire non diluée a été préparée pour chaque condition a été triée par la technique 10X genomics décrite dans la partie méthodes. En parallèle, cette même suspension enrichie a été diluée avec du sang frais afin de réduire la parasitémie à près de 1%. Un RSA^{0-3h} a ensuite été réalisé dans les conditions standard sur les souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION.

e) Analyse transcriptomique après tri monocellulaire des souches INITIALE, DÉRIVE et

PRESSION

Après enrichissement à la SLO, les échantillons INITIAL, DÉRIVE et PRESSION ont été exposés à 6h de DMSO ou DHA, puis analysés via la technique 10X genomics afin de séparer chaque cellule et d'en séquencer le contenu en ARN. Une librairie de transcrits a ainsi pu être créée, et différents groupes de gènes ont pu être distingués pour chaque condition (figure 31-AB). Ces données sont préliminaires et les analyses encore incomplètes. Les données de l'échantillon contrôle *K13*-sauvage n'ont pas été présentées en raison de résultats non interprétables. Les analyses statistiques n'ont pas encore été réalisées.

Six groupes de parasites ont été identifiés par étude transcriptomique après traitement au DMSO ou à la DHA. Tous les parasites exprimaient les gènes du groupe 0 (rose) seulement après exposition à la DHA. Ce groupe semble donc être associé aux parasites morts ou mourants.

Des différences dans les groupes de gènes exprimés par les souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION ont aussi été observées. Si l'on prend en compte uniquement la condition DMSO, le nombre de parasites du groupe 2 (vert foncé) a été fortement réduit par la dérive en culture, et augmenté de nouveau après mise sous pression. Ce groupe semble donc être associé à la résistance phénotypique à l'ART. Les parasites DÉRIVE présentent un nouveau groupe de parasites (groupe 3, bleu), qui n'est quasiment pas observé chez les parasites INITIAL et PRESSION. Le nombre de parasites du groupe 3 de l'échantillon DÉRIVE semble également diminué après traitement à la DHA.

Une analyse préliminaire des mécanismes biologiques associés montre que le groupe 3 contient des parasites exprimant des gènes associés au métabolisme des médicaments, ainsi que des gènes associés à la phosphorylation (résultats non présentés). Il est cependant impossible de proposer une interprétation construite à ce stade de l'analyse.

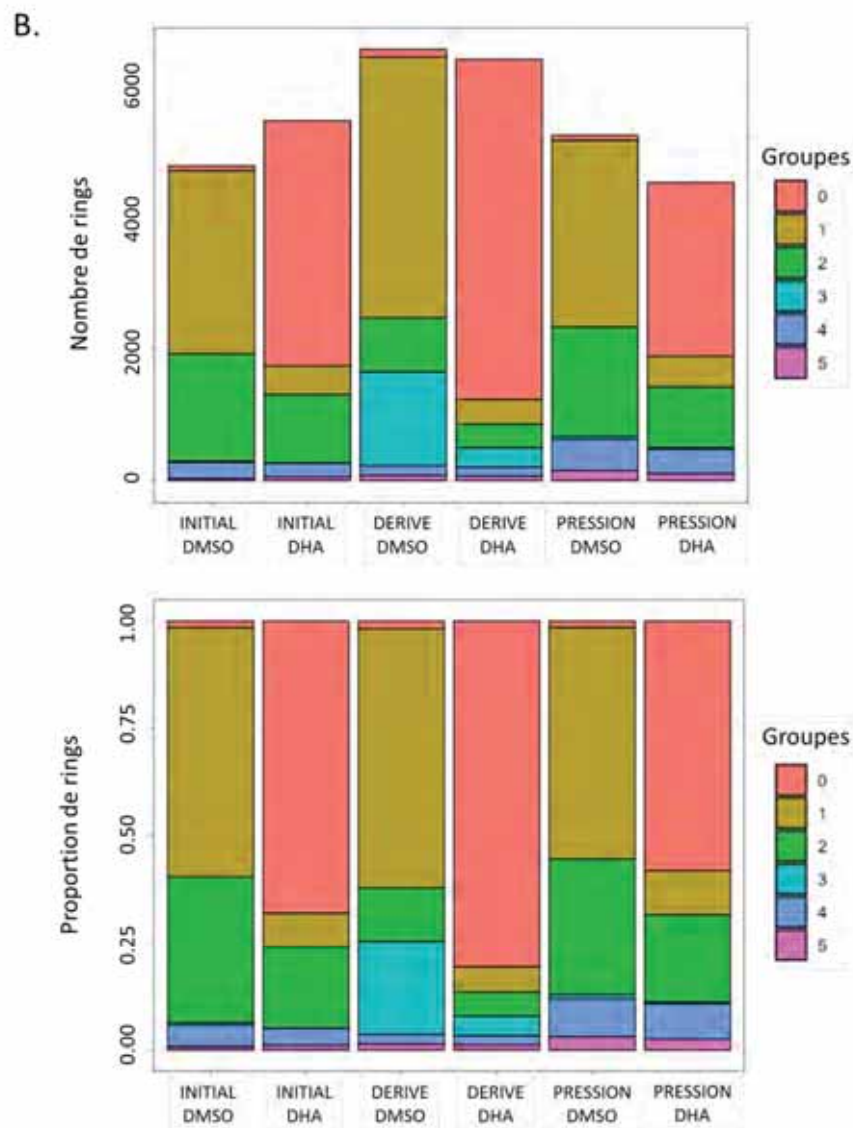
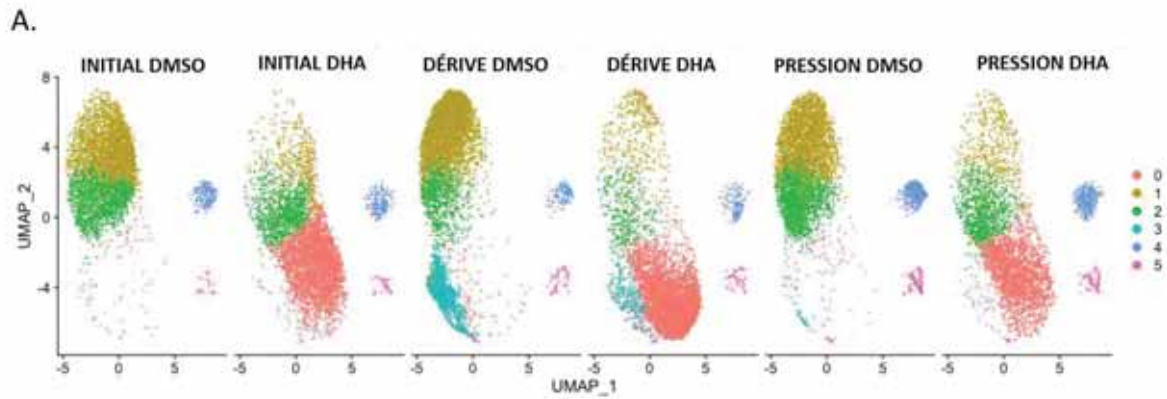


Figure 31: A. Visualisation par réduction dimensionnelle des différents groupes de parasites des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION après 6 heures de traitement au DMSO ou DHA – données préliminaires. UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection. B. Expression relative de chaque groupe (en nombre et proportion de parasites).

3. Discussion

Cette étude a été réalisée dans le but de mieux comprendre l'implication de gènes additionnels à *K13* dans la résistance à l'ART.

La présence d'isolats *K13*-sauvages résistants à l'ART au Cambodge démontre que le phénotype de résistance à l'ART n'est pas exclusivement associé à des mutations dans le gène *K13*. Ces isolats ont été observés dans une faible proportion (<5%), et présentaient pour la majorité un RSA inférieur à 10% de survie. Des souches *K13*-sauvages résistantes à l'ART avaient déjà été observées dans une précédente étude au Cambodge, dans une proportion et un niveau de résistance similaires (140).

Ces souches n'étaient pas associées à des échecs au traitement, bien qu'un tiers d'entre elles présentaient une amplification du gène *Pm2* ou *Mdr1*. Leur sous-représentation ne permet pas d'analyser la relation génotype-clinique avec précision.

Cette étude prouve néanmoins que la résistance à l'ART sans mutations dans le gène *K13* est possible. Le séquençage du génome complet des six échantillons *K13*-sauvages résistants est en cours d'analyse. Il sera comparé à celui d'isolats *K13*-sauvages sensibles afin d'identifier des modifications génétiques potentiellement impliquées dans la résistance à l'ART. Une analyse phylogénétique permettra de déterminer si ces parasites proviennent d'un groupe de parasites *K13*-sauvages distinct.

L'expérience de dérive-pression d'un isolat *K13*-C580Y a aussi permis de confirmer l'implication d'acteurs additionnels à *K13* dans la résistance à l'ART. Cette longue période d'adaptation en culture a conduit à la perte du phénotype de résistance à l'ART de cet isolat. Ce phénomène avait déjà été décrit pour plusieurs antipaludiques incluant la DHA (275). La mutation C580Y dans le gène *K13* a en revanche été conservée par l'isolat pendant toute la durée de l'expérience, montrant une stabilité importante de ce génotype. De précédentes études ont démontré un coût important de la résistance associée à la mutation C580Y sur le fitness des parasites (276,277). La perte du phénotype de résistance a aidé le parasite à réduire ce coût afin de faciliter sa croissance (comme le montre l'augmentation du taux de croissance parasitaire entre les souches INITIALE et PRESSION).

L'exposition de la souche DÉRIVE à la DHA a conduit à un regain rapide du phénotype de résistance. Pour un même profil *K13* et un même fond génétique, les variations de susceptibilité à l'ART de cet échantillon étaient donc très importantes. Cela suggère l'implication de mécanismes de régulation génétiques et possiblement épigénétiques, faisant intervenir ou non le gène *K13* en amont.

Notre étude vise à compléter l'important travail déjà effectué pour décrire le transcriptome des parasites résistants à l'ART par techniques conventionnelles (études d'association pangénomiques (GWAS) et études d'association transcriptomiques (TWAS)). Rocamora *et al.* avaient aussi adopté une stratégie de culture au long terme, mais dans une logique inverse, en induisant la résistance de la souche 3D7 en culture. Cette étude avait identifié une surexpression de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation (Unfolded Protein Response (UPR)) et dans la réponse au stress oxydatif des parasites devenus résistants, en l'absence de mutation dans le gène *K13* (123). Ces résultats concordaient avec une précédente étude transcriptomique effectuée sur des parasites collectés dans la région du Grand Mékong, ayant aussi identifié l'importance de ces voies biologiques dans la résistance à l'ART (124). Plus récemment, les niveaux de transcription de 325 gènes ont été identifiés comme étant associés à la résistance à l'ART de parasites collectés dans la région du Grand Mékong (270).

Le cycle de dérive-pression a permis d'obtenir trois souches de même fond génétique, mais présentant des niveaux de résistance à l'ART significativement différents. La comparaison des transcriptomes de ces souches devrait apporter un éclairage important sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle que subit une souche lorsqu'elle perd sa résistance, mais aussi sur la façon dont elle la regagne après remise sous pression. Nous avons pour cela utilisé la technique « 10X genomics », qui permet le séquençage de nouvelle génération des transcrits présent dans une cellule individuelle (single cell RNA sequencing). Cette méthode a l'avantage d'être hautement résolutive et capable d'identifier des différences minimales entre populations cellulaires, ou bien encore des populations cellulaires rares. Le protocole technique adapté à notre problématique a été validé. Le nombre de

cellules collectées, ainsi que la qualité des ARN et des séquences obtenues étaient satisfaisants. Les gènes potentiellement impliqués dans cette régulation sont en cours d'identification. Les candidats pourront par la suite être comparés à ceux identifiés au cours de précédentes études (123,124,270).

Après analyse préliminaire des séquences ARN des souches INITIALE, DÉRIVE et PRESSION exposées ou non à la DHA, six groupes de parasites ont pu être identifiés. L'exposition à la DHA semblait moduler la répartition de ces groupes, pour les trois souches testées. Des différences de proportions au sein de ces différents groupes ont aussi pu être observées entre les souches INITIAL, DÉRIVE et PRESSION exposées au DMSO.

L'analyse est maintenant orientée vers l'identification de modifications impliquées dans la perte de la résistance à l'ART entre les souches INITIALE et DÉRIVE. Les souches INITIAL et PRESSION semblent présenter un transcriptome similaire, puisqu'elles présentent un phénotype résistant à l'ART. Toutefois, la souche PRESSION (RSA = 10-20%) n'a jamais regagné la résistance de la souche INITIALE (RSA = 30-40%). Cette observation peut s'expliquer par un coût trop important d'un niveau de résistance élevé sur la croissance parasitaire. L'analyse transcriptomique en cours devrait permettre d'observer par quels mécanismes biologiques les parasites adaptés réduisent ce coût biologique.

Si un ou plusieurs gènes venaient à être identifiés, il serait intéressant de les comparer avec les gènes potentiellement impliqués dans la résistance des parasites *K13*-sauvages. Il serait aussi pertinent de mesurer l'expression de ces gènes par qPCR pour d'autres parasites collectés au Cambodge mais aussi en Afrique. Leur association avec la résistance à l'ART devra ensuite être confirmée par édition du génome (modification de ces gènes candidats par CRISPR-Cas9 par exemple).

Conclusion générale

P. falciparum co-évolue avec l'Homme depuis environ 50000 ans (278). En interagissant avec ses hôtes (Homme et anophèle), le parasite est exposé à de nombreuses pressions environnementales (système immunitaire, compétition entre parasites, pression médicamenteuse, etc.). Sa survie et sa transmission nécessitent par conséquent un remodelage constant de son génome, lui permettant d'acquérir de nouveaux traits biologiques.

En Asie du Sud-Est, une faible biomasse parasitaire a été massivement exposée aux thérapies antipaludiques depuis près d'un siècle. En conséquence, le parasite a développé des résistances à une longue liste de traitements, incluant les CTA. Le Cambodge est l'épicentre de l'émergence de ces résistances probablement en raison d'une combinaison de facteurs (forte exposition aux antipaludiques, grande majorité de souches monoclonales, hémoglobinopathies, taux de mutations important...). L'élimination de *P. falciparum* est envisageable en Asie du Sud-Est, néanmoins la problématique des résistances pourrait rendre cet objectif inatteignable. Il est donc absolument nécessaire de mettre en place des stratégies de surveillance et d'élimination des résistances.

Nous avons montré que l'utilisation récente de l'AS-MQ au Cambodge a conduit à l'émergence de parasites résistants à cette combinaison, au détriment des parasites résistants à la DHA-PPQ qui tendent aujourd'hui à disparaître. Malgré une efficacité encore satisfaisante de l'AS-MQ, un changement rapide des politiques de traitement pourrait permettre de limiter la sélection des clones résistants, portant ainsi le coup de grâce au peu de parasites persistant au Cambodge.

Un rare profil de parasites « triple-mutants » doublement résistants à la PPQ et MQ identifié au Cambodge a aussi été décrit. Les deux mécanismes de résistance étant antagonistes, ce degré de multi-résistance souligne l'extrême capacité d'adaptation de *P. falciparum*.

Afin de ne pas laisser s'installer de tels profils de résistance, il est important de renouveler régulièrement le panel de molécules utilisées. L'AS-PYR semble à l'heure actuelle et parmi les nouvelles combinaisons testées la seule en mesure de remplacer l'AS-MQ. L'AS-PYR est cependant

utilisé depuis 2017 au Cambodge et il n'est pas exclu que des clones résistants à cette combinaison existent déjà. Il est donc nécessaire de poursuivre le développement de nouvelles molécules.

De façon étonnante, l'utilisation massive de CTA en Afrique n'a pas encore conduit à l'émergence de parasites résistants. L'excellente efficacité de la DHA-PPQ au Cameroun en est un bon exemple. La densité parasitaire et les niveaux de transmission sont tels que la compétition entre parasites prévaut, le coût de la résistance sur leur croissance étant probablement désavantageux. Malgré l'absence de résistance aux CTA en Afrique, il est nécessaire de poursuivre la surveillance afin d'identifier une émergence indépendante, ou d'éviter une potentielle diffusion de parasites résistants de l'Asie vers l'Afrique, comme ce fut le cas pour la CQ et la SP, entraînant des conséquences dramatiques en termes de santé publique.

La meilleure compréhension du mécanisme de résistance à l'ART permettrait d'optimiser la surveillance de la résistance aux CTA, notamment en Afrique. Nous avons montré que la résistance à l'ART était possible en l'absence de mutation dans le gène *K13*. De plus, les mécanismes de régulation conduisant à la variation des niveaux de résistance à l'ART semblent se mettre en place rapidement. L'utilisation massive d'ART pourrait donc sélectionner des parasites résistants non-détectables via les outils génétiques actuels. La découverte de nouveaux acteurs impliqués dans la résistance à l'ART par « single cell RNA sequencing » pourrait élargir le panel de marqueurs diagnostiques, aujourd'hui limité au gène *K13*.

RÉFÉRENCES

1. World Health Organization. World malaria report 2019. <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
2. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012; 4(1):e2012026-e2012026.
3. World Health Organization, Global Malaria Programme, UNICEF. Achieving the malaria MDG target: reversing the incidence of malaria 2000-2015; 2015. [Http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/184521/1/9789241509442_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/184521/1/9789241509442_eng.pdf?ua=1)
4. World Health Organization, Global Malaria Program. Global technical strategy for malaria, 2016-2030; 2015. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/en/>
5. World Health Organization. Becoming malaria-free by 2020. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/becoming-malaria-free-by-2020>; 2019.
6. Blasco B, Leroy D, Fidock DA. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat Med.* 2017;23(8):917-28.
7. Rosenthal PJ, ed. Antimalarial Chemotherapy. Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery. Totowa, New Jersey, Humana Press, 2001.
8. Aden Abdi Y, Gustafsson LI, Ericsson O, Hellgren U. Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections. Second edition. London, CRC Press, 1995.
9. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J.* 2011; 10:144.
10. Sinclair D, Donegan S, Isba R, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; (6). [Doi:10.1002/14651858.CD005967.pub4/14651858.CD005967.pub4/abstract](https://doi.org/10.1002/14651858.CD005967.pub4/14651858.CD005967.pub4/abstract)
11. Dellicour S, Sevene E, McGready R, Tinto H, Mosha D, Manyando C, et al. First-trimester artemisinin derivatives and quinine treatments and the risk of adverse pregnancy outcomes in Africa and Asia: A meta-analysis of observational studies. *PLOS Med.* 2017; 14(5):e1002290.
12. Peters W. Antimalarial drug resistance: an increasing problem. *Br Med Bull.* 1982; 38(2):187-92.
13. Croft AM. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J R Soc Med.* 2007; 100(4):170-4.
14. Dow G, Bauman R, Caridha D, Cabezas M, Du F, Gomez-Lobo R, et al. Mefloquine induces dose-related neurological effects in a rat model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(3):1045-53.
15. Boudreau E, Webster HK, Pavanand K, Thosingha L. Type II mefloquine resistance in Thailand. *The Lancet.* 11 déc 1982; 320(8311):1335.

16. Anonyme. Project 523; 2019. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Project_523&oldid=918749589
17. World Health Organization. Practical chemotherapy of malaria : report of a WHO scientific group. Technical Report Series 805, 1990. [meeting held in Geneva from 5 to 12 June 1989]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39778>
18. Djimdé A, Lefèvre G. Understanding the pharmacokinetics of Coartem®. *Malar J.* 2009; 8(1):S4.
19. Nzila A, Okombo J, Ohuma E, Al-Thukair A. Update on the in vivo tolerance and in vitro reduced susceptibility to the antimalarial lumefantrine. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10):2309-15.
20. Raman J, Kagoro FM, Mabuza A, Malatje G, Reid A, Freaun J, et al. Absence of kelch13 artemisinin resistance markers but strong selection for lumefantrine-tolerance molecular markers following 18 years of artemisinin-based combination therapy use in Mpumalanga Province, South Africa (2001–2018). *Malar J.* 2019; 18(1):280.
21. Sisowath C, Ferreira PE, Bustamante LY, Dahlström S, Mårtensson A, Björkman A, et al. The role of pfmdr1 in Plasmodium falciparum tolerance to artemether-lumefantrine in Africa: pfmdr1 and artemether-lumefantrine. *Trop Med Int Health.* 2007; 12(6):736-42.
22. Oaks SC Jr, Mitchell VS, Pearson GW, Carpenter CCJ (eds). A report of the Committee for the Study on Malaria Prevention and Control: Status Review and Alternative Strategies. Division of International Health, Institute of Medicine. *Malaria: Obstacles and Opportunities.* National Academies Press (US); 1991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234321/>
23. Institute of Medicine Committee on the Economics of Antimalarial Drugs. Arrow KJ, Panosian C, Gelband H, eds. « Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance » National Academies Press, 2004. <https://www.nap.edu/read/11017/chapter/3>
24. Payne D. Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *Parasitol Today Pers Ed.* 1987; 3(8):241-6.
25. Packard RM. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *N Engl J Med.* 2014; 371(5):397-9.
26. Basco LK, Ringwald P. In Vitro Activities of Piperaquine and Other 4-Aminoquinolines against Clinical Isolates of Plasmodium falciparum in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1391-4.
27. Lan CX, Lin X, Huang ZS, Chen YS, Guo RN. In vivo sensitivity of Plasmodium falciparum to piperaquine phosphate assayed in Linshui and Baisha counties, Hainan Province. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 1989;7(3):163-5.
28. Guo XB. Randomised comparison on the treatment of falciparum malaria with dihydroartemisinin and piperaquine. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1993; 73(10):602-4, 638.
29. Chen L. Recent studies on antimalarial efficacy of piperaquine and hydroxypiperaquine. *Chin Med J (Engl).* 1991; 104(2):161-3.
30. J. Prankerd. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Academic Press; 1992. 709 p.

31. Krishna S, White NJ. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. *Clin Pharmacokinet*. 1996; 30(4):263-99.
32. White NJ. The treatment of malaria. *N Engl J Med*. 1996; 335(11):800-6.
33. Ochong EO, van den Broek IVF, Keus K, Nzila A. 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(2):184-7.
34. Childs GE, Boudreau EF, Milhous WK, Wimonwatratee T, Pooyindee N, Pang L, et al. A comparison of the in vitro activities of amodiaquine and desethylamodiaquine against isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 40(1):7-11.
35. Nzila A. The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(6):1043-54.
36. Sibley CH, Hyde JE, Sims PFG, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, et al. Pyrimethamine–sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*. 2001; 17(12):570-1.
37. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O’Neill PM, et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(5):977-85.
38. Staines HM, Burrow R, Teo BH-Y, Chis Ster I, Kremsner PG, Krishna S. Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(3):581-95.
39. Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin Med J (Engl)*. 1979; 92(12):811-6.
40. Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*. 1996; 60(2):301-15.
41. World Health Organization. World malaria report 2018.
42. White NJ, Pongtavornpinyo W, Maude RJ, Saralamba S, Aguas R, Stepniewska K, et al. Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance. *Malar J*. 2009; 8:253.
43. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008; 359(24):2619-20.
44. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(3):156-70.
45. 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(5):411-23.
46. Elderfield RC, Mertel HE, Mitch RT, Wempen IM, Werble E. Synthesis of Primaquine and Certain of its Analogs1. *J Am Chem Soc*. 1 sept 1955;77(18):4816-9.
47. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem*. 2009; 44(3):937-53.

48. Carmona-Fonseca J, Álvarez G, Maestre A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of primaquine treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(2):188-93.
49. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition, 2015. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1
50. Mbaye A, Dieye B, Ndiaye YD, Bei AK, Muna A, Deme AB, et al. Selection of N86F184D1246 haplotype of *Pfmdr1* gene by artemether–lumefantrine drug pressure on *Plasmodium falciparum* populations in Senegal. *Malar J.* 2016; 15(1):433.
51. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Sowunmi A, Hudson T, O’Neil M, et al. Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(3):888-95.
52. Zwang J, Olliaro P, Barennes H, Bonnet M, Brasseur P, Bukirwa H, et al. Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated *falciparum* malaria in sub-Saharan Africa: a multi-centre analysis. *Malar J.* 2009; 8:203.
53. Rwagacondo CE, Karema C, Mugisha V, Erhart A, Dujardin J-C, Van Overmeir C, et al. Is amodiaquine failing in Rwanda? Efficacy of amodiaquine alone and combined with artesunate in children with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health.* 2004; 9(10):1091-8.
54. WWARN. WWARN Explorer: Mapping summary data from antimalarial drug studies; 2017. <https://www.wwarn.org/explorer/app/#filter=1&Date=1977-2017&Drug=AQ&TreatmentType=all;mapset=1&zoom=3>;
55. Agarwal A, McMorro M, Onyango P, Otieno K, Odero C, Williamson J, et al. A randomized trial of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine in the treatment of uncomplicated malaria among children in western Kenya. *Malar J.* 2013; 12:254.
56. Yeka A, Dorsey G, Kanya MR, Talisuna A, Lugeswa M, Rwakimari JB, et al. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS ONE.* 2008; 3(6):e2390.
57. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in zaire and Uíge provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(1):437-43.
58. Nambozi M, Van Geertruyden J-P, Hachizovu S, Chaponda M, Mukwamataba D, Mulenga M, et al. Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Zambian children. *Malar J.* 2011; 10:50.
59. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J.* 2009; 8:10.
60. Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites

- presenting high survival rates in novel piperazine in vitro assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med.* 2015; 13:305.
61. Imwong M, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Dondorp AM, White NJ. Spread of a single multidrug resistant malaria parasite lineage (PfPailin) to Vietnam. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(10):1022-3.
 62. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(5):491-7.
 63. Chaorattanakawee S, Lon C, Jongsakul K, Gawee J, Sok SSundrakes S, et al. Ex vivo piperazine resistance developed rapidly in *Plasmodium falciparum* isolates in northern Cambodia compared to Thailand. *Malar. J.* 2016; 15:519.
 64. Leang R, Taylor WRJ, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(8):4719-26.
 65. Chaorattanakawee S, Saunders DL, Sea D, Chanarat N, Yingyuen K, Sundrakes S, et al. Ex Vivo Drug Susceptibility Testing and Molecular Profiling of Clinical *Plasmodium falciparum* Isolates from Cambodia from 2008 to 2013 Suggest Emerging Piperazine Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(8):4631-43.
 66. Medicines for Malaria Venture. ASMQ (artesunate-mefloquine) 2019. <https://www.mmv.org/access/products-projects/asmq-artesunate-mefloquine>
 67. Sirima SB, Ogutu B, Lusingu JPA, Mtoro A, Mrango Z, Ouedraogo A, et al. Comparison of artesunate–mefloquine and artemether–lumefantrine fixed-dose combinations for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children younger than 5 years in sub-Saharan Africa: a randomised, multicentre, phase 4 trial. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(10):1123-33.
 68. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *Falciparum* malaria on the Cambodia–Thailand border. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(5):716-9.
 69. Phyto AP. Declining efficacy of mefloquine-artesunate combination and relative role of drug-resistant molecular markers: Thai-Myanmar border 2003-2013. *Int J Infect Dis.* 2016; 45:15.
 70. Na-Bangchang K, Muhamad P, Ruaengweerayut R, Chaijaroenkul W, Karbwang J. Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border: integration of clinico-parasitological response, systemic drug exposure, and in vitro parasite sensitivity. *Malar J.* 2013; 12:263.
 71. Dorsey G, Njama D, Kanya MR, Cattamanchi A, Kyabayinze D, Staedke SG, et al. Sulfadoxine/pyrimethamine alone or with amodiaquine or artesunate for treatment of uncomplicated malaria: a longitudinal randomised trial. *The Lancet.* 2002; 360(9350):2031-8.
 72. World Health Organization, Global Malaria Program. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy: Status report. 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274362/WHO-CDS-GMP-2018.18-eng.pdf?ua=1>

73. Organisation Mondiale de la Santé. Résistance aux antimicrobiens. 2017, WHO. [Http://www.who.int/antimicrobial-resistance/fr/](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/fr/)
74. Butler D. Malaria vaccine gives disappointing results. *Nat News*; 2012. [Http://www.nature.com/news/malaria-vaccine-gives-disappointing-results-1.11785](http://www.nature.com/news/malaria-vaccine-gives-disappointing-results-1.11785). Doi:10.1038/nature.2012.11785
75. King A. Building a better malaria vaccine. *Nature*; 2019; 575(7784):S51-4.
76. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*. 2004; 113(8):1084-92.
77. Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Dondorp A, White LJ, Maude RJ, Saralamba S, et al. Probability of emergence of antimalarial resistance in different stages of the parasite life cycle: Drug resistance in malaria's life cycle. *Evol Appl*. 2009; 2(1):52-61.
78. White NJ, Pongtavornpinyo W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 2003; 270(1514):545-54.
79. Matthews H, Duffy CW, Merrick CJ. Checks and balances? DNA replication and the cell cycle in *Plasmodium*. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1):216.
80. Rathod PK, McErlean T, Lee PC. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(17):9389-93.
81. Singh GP, Sharma A. South-East Asian strains of *Plasmodium falciparum* display higher ratio of non-synonymous to synonymous polymorphisms compared to African strains. *F1000Research*. 2016; 5:1964.
82. Lee AH, Fidock DA. Evidence of a mild mutator phenotype in Cambodian *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *PLoS ONE*. 2016; 11(4):e0154166.
83. Ataide R, Ashley EA, Powell R, Chan J-A, Malloy MJ, O'Flaherty K, et al. Host immunity to *Plasmodium falciparum* and the assessment of emerging artemisinin resistance in a multinational cohort. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(13):3515-20.
84. Barnes KI, White NJ. Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop*. 2005; 94(3):230-40.
85. Targett G, Drakeley C, Jawara M, von Seidlein L, Coleman R, Deen J, et al. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Infect Dis*. 2001; 183(8):1254-9.
86. Bell AS, Huijben S, Paaijmans KP, Sim DG, Chan BHK, Nelson WA, et al. Enhanced transmission of drug-resistant parasites to mosquitoes following drug treatment in rodent malaria. *PLoS ONE*. 2012; 7(6):e37172.
87. Goodman CD, Siregar JE, Mollard V, Vega-Rodriguez J, Syafruddin D, Matsuoka H, et al. Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science*. 2016; 352(6283):349-53.
88. Kaufmann C, Briegel H. Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol*. 2004; 29(1):140-53.

89. Packard RM. The origins of antimalarial-drug resistance. *N Engl J Med.* 2014; 371(5):397-9.
90. Roberts. Drug resistance triggers war to wipe out malaria in the Mekong region. *Science*; 2016. <https://www.sciencemag.org/news/2016/04/drug-resistance-triggers-war-wipe-out-malaria-mekong-region>
91. Hamilton WL, Amato R, Pluijm RW van der, Jacob CG, Quang HH, Thuy-Nhien NT, et al. Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(9):943-51.
92. Amato R, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3):337-45.
93. Miotto O, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2015; 47(3):226-34.
94. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.* 2012; 9(2):e1001169.
95. Muraleedharan KM, Avery MA. Advances in the discovery of new antimalarials. *Comprehensive Med Chem II.* 2007; 7:765-814.
96. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002; 419(6906):498-511.
97. Belen Cassera M, Zhang Y, Z. Hazleton K, L. Schramm V. Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum*. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(16):2103-15.
98. Ferone R. Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ.* 1977; 55(2-3):291-8.
99. Plowe CV, Kublin JG, Doumbo OK. *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resist Updat.* 1998; 1(6):389-96.
100. Slomianny C, Prensier G. Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J Parasitol.* 1986; 72(4):595-8.
101. Divo AA, Geary TG, Jensen JB, Ginsburg H. The mitochondrion of *Plasmodium falciparum* visualized by rhodamine 123 fluorescence. *J Protozool.* 1985; 32(3):442-6.
102. Aldritt SM, Joseph JT, Wirth DF. Sequence identification of cytochrome b in *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol.* 1989; 9(9):3614-20.
103. Feagin JE. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 52(1):145-8.
104. Vaidya AB, Akella R, Suplick K. Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 1989; 35(2):97-107.

105. Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem.* 1997; 272(7):3961-6.
106. Fry M, Pudney M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3- hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol.* 1992; 43(7):1545-53.
107. van Dooren GG, Stimmler LM, McFadden GI. Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30(4):596-630.
108. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol.* 1999; 33(4):704-11.
109. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li Y, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. *PLoS ONE.* 2010; 5(3):e9582.
110. Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature.* 2000; 404(6775):307-10.
111. Rathore D, Jani D, Nagarkatti R, Kumar S. Heme detoxification and antimalarial drugs – Known mechanisms and future prospects. *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2006; 3(2):153-8.
112. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules.* 2010; 15(3):1705-21.
113. Meunier B, Robert A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Acc Chem Res.* 2010; 43(11):1444-51.
114. Klonis N, Xie SC, McCaw JM, Crespo-Ortiz MP, Zaloumis SG, Simpson JA, et al. Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(13):5157-62.
115. Sullivan DJ. Timing is everything for artemisinin action. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(13):4866-7.
116. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(12):1043-9.
117. Ferreira PE, Culleton R, Gil JP, Meshnick SR. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum: what is it really? *Trends Parasitol.* 2013; 29(7):318-20.
118. 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(5):1872-7.
119. Ménard S, Ben Haddou T, Ramadan AP, Arieu F, Iriart X, Beghain J, et al. Induction of multidrug tolerance in Plasmodium falciparum by extended artemisinin pressure. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(10):1733-41.

120. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014; 505(7481):50-5.
121. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*. 2015; 347(6220):428-31.
122. Ghorbal M, Gorman M, Macpherson CR, Martins RM, Scherf A, Lopez-Rubio J-J. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(8):819-21.
123. Rocamora F, Zhu L, Liong KY, Dondorp A, Miotto O, Mok S, et al. Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2018; 14(3):e1006930.
124. Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, et al. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*. 2015; 347(6220):431-5.
125. Dogovski C, Xie SC, Burgio G, Bridgford J, Mok S, McCaw JM, et al. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol*. 2015; 13(4):e1002132.
126. Mok S, Imwong M, Mackinnon MJ, Sim J, Ramadoss R, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is associated with an altered temporal pattern of transcription. *BMC Genomics*. 2011; 12(1):391.
127. Zhang M, Mishra S, Sakthivel R, Rojas M, Ranjan R, Sullivan WJ, et al. PK4, a eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) kinase, is essential for the development of the erythrocytic cycle of *Plasmodium*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(10):3956-61.
128. Breglio KF, Rahman RS, Sã JM, Hott A, Roberts DJ, Wellems TE. Kelch mutations in *Plasmodium falciparum* protein K13 do not modulate dormancy after artemisinin exposure and sorbitol selection *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(5):e02256-17. Correction, 2018;62(11):e02070-18.
129. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(19):8477-86.
130. Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, Fidock DA. Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2016; 32(9):682-96.
131. Gibbons J, Button-Simons KA, Adapa SR, Li S, Pietsch M, Zhang M, et al. Altered expression of K13 disrupts DNA replication and repair in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2018; 19(1):849.
132. Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau J-M, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J*. 2016; 15(1):149.
133. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2015; 520(7549):683-7.

134. Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood*. 2010; 115(12):2500-7.
135. Birnbaum J, Scharf S, Schmidt S, Jonscher E, Hoeijmakers WAM, Flemming S, et al. A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science*. 2020; 367(6473):51-9.
136. Yang T, Yeoh LM, Tutor MV, Dixon MW, McMillan PJ, Xie SC, et al. Decreased K13 abundance reduces hemoglobin catabolism and proteotoxic stress, underpinning artemisinin resistance. *Cell Rep*. 2019; 29(9):2917-2928.e5.
137. Sidhu ABS, Uhlemann A-C, Valderramos SG, Valderramos J-C, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*. 2006; 194(4):528-35.
138. Xie SC, Dogovski C, Hanssen E, Chiu F, Yang T, Crespo MP, et al. Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins. *J Cell Sci*. 2016; 129(2):406-16.
139. Siddiqui FA, Cabrera M, Wang M, Brashear A, Kemirembe K, Wang Z, et al. *Plasmodium falciparum* *falcipain-2a* polymorphisms in Southeast Asia and their association with artemisinin resistance. *J Infect Dis*. 2018; 218(3):434-42.
140. Mukherjee A, Bopp S, Magistrado P, Wong W, Daniels R, Demas A, et al. Artemisinin resistance without *pfkelch13* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Cambodia. *Malar J*. 2017; 16(1):195.
141. Das S, Saha B, Hati AK, Roy S. Evidence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in eastern India. *N Engl J Med*. 2018; 379(20):1962-4.
142. Miotto O, Sekihara M, Tachibana S-I, Yamauchi M, Pearson RD, Amato R, et al. Emergence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with *kelch13* C580Y mutations on the island of New Guinea. *bioRxiv*. 2019; 621813.
143. Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, et al. Emergence of indigenous artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N Engl J Med*. 2017; 376(10):991-3.
144. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnikaa AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, et al. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *N Engl J Med*. 2016; 374(25):2453-64.
145. Tun KM, Imwong M, Lwin KM, Win AA, Hlaing TM, Hlaing T, et al. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(4):415-21.
146. 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(8):1352-5.
147. Rosenthal PJ. Artemisinin resistance outside of Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99(6):1357-9.

148. 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(5):680-8.
149. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, et al. Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis.* 2016; 213(9):1472-5.
150. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2):174-83.
151. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2):164-73.
152. Mukherjee A, Gagnon D, Wirth DF, Richard D. Inactivation of plasmepsins 2 and 3 sensitizes *Plasmodium falciparum* to the antimalarial drug piperazine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(4):e02309-17.
153. Dhingra SK, Redhi D, Combrinck JM, Yeo T, Okombo J, Henrich PP, et al. A variant PfCRT isoform can contribute to *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line partner drug piperazine. *mBio.* 2017; 8(3):e00303-17.
154. Loesbanluechai D, Kotanan N, de Cozar C, Kochakarn T, Ansbro MR, Chotivanich K, et al. Overexpression of plasmepsin II and plasmepsin III does not directly cause reduction in *Plasmodium falciparum* sensitivity to artesunate, chloroquine and piperazine. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019; 9:16-22.
155. Lehane AM, Kirk K. Chloroquine resistance-conferring mutations in *pfprt* give rise to a chloroquine-associated H⁺ leak from the malaria parasite's digestive vacuole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(12):4374-80.
156. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* 2011; 585(11):1551-62.
157. Agrawal S, Moser KA, Morton L, Cummings MP, Parihar A, Dwivedi A, et al. Association of a novel mutation in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter with decreased piperazine sensitivity. *J Infect Dis.* 2017; 216(4):468-76.
158. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kumpornsin K, et al. Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperazine. *Nat Commun.* 2018; 9(1):1-13.
159. Gabryszewski SJ, Dhingra SK, Combrinck JM, Lewis IA, Callaghan PS, Hassett MR, et al. Evolution of fitness cost-neutral mutant PfCRT conferring *P. falciparum* 4-Aminoquinoline drug resistance is accompanied by altered parasite metabolism and digestive vacuole physiology. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11):e1005976.
160. Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C. Dihydroartemisinin–piperazine failure in Cambodia. *N Engl J Med.* 2014; 371(5):484-5.

161. Leang R, Barrette A, Bouth DM, Menard D, Abdur R, Duong S, et al. Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(2):818-26.
162. Pluijm RW van der, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(9):952-61.
163. Dhingra SK, Gabryszewski SJ, Small-Saunders JL, Yeo T, Henrich PP, Mok S, et al. Global spread of mutant PfCRT and its pleiotropic impact on *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and fitness. *mBio.* 2019; 10(2):e02731-18
164. Hamilton WL, Amato R, Pluijm RW van der, Jacob CG, Quang HH, Thuy-Nhien NT, et al. Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(9):943-51.
165. Inoue J, Silva M, Fofana B, Sanogo K, Mårtensson A, Sagara I, et al. *Plasmodium falciparum* Plasmepsin 2 Duplications, West Africa. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24(8):1591-3.
166. Leroy D, Macintyre F, Adoke Y, Ouoba S, Barry A, Mombo-Ngoma G, et al. African isolates show a high proportion of multiple copies of the *Plasmodium falciparum* plasmepsin-2 gene, a piperaquine resistance marker. *Malar J.* 2019; 18(1):126.
167. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet.* 2004; 364(9432):438-47.
168. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2000; 403(6772):906-9.
169. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. 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.* 2000; 108(1):13-23.
170. Veiga MI, Ferreira PE, Malmberg M, Jörnshagen L, Björkman A, Nosten F, et al. *pfmdr1* amplification is related to increased *Plasmodium falciparum* in vitro sensitivity to the bisquinoline piperaquine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(7):3615-9.
171. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner SF, Mukherjee A, Lim P, et al. Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun.* 2018; 9(1):1-10.
172. Parobek CM, Parr JB, Brazeau NF, Lon C, Chaorattanakawee S, Gosi P, et al. Partner-drug resistance and population substructuring of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Genome Biol Evol.* 2017; 9(6):1673-86.
173. Rossi G, Smet MD, Khim N, Kindermans J-M, Menard D. Emergence of *Plasmodium falciparum* triple mutant in Cambodia. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(12):1233.

174. Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, Pongtavornpinyo W, Dondorp AM, Day NPJ, et al. *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4):1509-15.
175. Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, et al. *Pfmdr1* and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria on the Cambodian–Thai border. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(4):641-7.
176. Gobbi F, Rossanese A, Buonfrate D, Angheben A, Lunardi G, Bisoffi Z. Failure of malaria chemoprophylaxis with mefloquine in an oversize traveller to Mozambique. *Malar J.* 2013; 12:451.
177. Ooi WW. Failure of mefloquine prophylaxis in East Africa. *N Engl J Med.* 1991; 324(2):130.
178. Costa GL, Amaral LC, Fontes CJF, Carvalho LH, de Brito CFA, de Sousa TN. Assessment of copy number variation in genes related to drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon and a systematic review of the literature. *Malar J.* 2017; 16(1):152.
179. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization, 2009. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44048/9789241597531_eng.pdf
180. Witkowski B, Khim N, Chim P, Kim S, Ke S, Kloeung N, et al. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in Western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(2):914-23.
181. Zhang J, Feng G-H, Zou C-Y, Su P-C, Liu H-E, Yang Z-Q. Overview of the improvement of the ring-stage survival assay—a novel phenotypic assay for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Zool Res.* 2017; 38(6):317-20.
182. Amaratunga C, Neal AT, Fairhurst RM. Flow Cytometry-Based Analysis of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in the Ring-Stage Survival Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(8):4938-40.
183. Davis SZ, Singh PP, Vendrely KM, Shoue DA, Checkley LA, McDew-White M, et al. The extended recovery ring-stage survival assay provides superior prediction of patient clearance half-life and increases throughput. *Malar J* 2019; 19:54.
184. Cowell AN, Winzeler EA. The genomic architecture of antimalarial drug resistance. *Brief Funct Genomics.* 2019; 18(5):314-28.
185. Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, et al. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(5):836-42.
186. Falk N, Maire N, Sama W, Owusu-Agyei S, Smith T, Beck H-P, et al. Comparison of PCR-RFLP and Genescan-based genotyping for analyzing infection dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(6):944-50.
187. Liljander A, Wiklund L, Falk N, Kweku M, Mårtensson A, Felger I, et al. Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (*m*sp1 and 2). *Malar J.* 2009; 8:78.

188. Bannister-Tyrrell M, Gryseels C, Sokha S, Dara L, Sereiboth N, James N, et al. Forest goers and multidrug-resistant malaria in Cambodia: an ethnographic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2019; 100(5):1170-8.
189. Bannister-Tyrrell M, Srun S, Sluydts V, Gryseels C, Mean V, Kim S, et al. Importance of household-level risk factors in explaining micro-epidemiology of asymptomatic malaria infections in Ratanakiri Province, Cambodia. *Sci Rep.* 2018; 8(1):1-15.
190. Erickson-Davis M. NASA releases images of dramatic deforestation in Cambodia. *Mongabay Environmental News.* 2017. <https://news.mongabay.com/2017/01/nasa-releases-images-of-dramatic-cambodia-deforestation/>
191. World Health Organization. Fighting malaria in the last pockets of Cambodia. <https://www.who.int/cambodia/news/commentaries/22-04-2019-fighting-malaria-in-the-last-pockets-of-cambodia>
192. Durnez L, Mao S, Denis L, Roelants P, Sochantha T, Coosemans M. Outdoor malaria transmission in forested villages of Cambodia. *Malar J.* 2013; 12:329.
193. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2009; 8:19.
194. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1):13-36.
195. Peto TJ, Debackere M, Etienne W, Vernaev L, Tripura R, Falq G, et al. Community participation during two mass anti-malarial administrations in Cambodia: lessons from a joint workshop. *Malar J.* 2018; 17(1):53.
196. Tripura R, Peto TJ, Chea N, Chan D, Mukaka M, Sirithiranont P, et al. A controlled trial of mass drug administration to interrupt transmission of multidrug-resistant *Falciparum* malaria in Cambodian villages. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2018; 67(6):817-26.
197. von Seidlein L, Peto TJ, Landier J, Nguyen T-N, Tripura R, Phommasone K, et al. The impact of targeted malaria elimination with mass drug administrations on falciparum malaria in Southeast Asia: a cluster randomised trial. *PLOS Med.* 2019; 16(2):e1002745.
198. Antonio-Nkondjio C, Ndo C, Njiokou F, Bigoga JD, Awono-Ambene P, Etang J, et al. Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1):501.
199. President's Malaria Initiative. Malaria Operational Plan FY, 2019. [fy-2019-cameroon-malaria-operational-plan.pdf](#).
200. Gunalan K, Niangaly A, Thera MA, Doumbo OK, Miller LH. *Plasmodium Vivax* infections of duffy-negative erythrocytes: historically undetected or a recent adaptation? *Trends Parasitol.* 2018; 34(5):420-9.
201. Antonio-Nkondjio C, Keraf CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, et al. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol.* 2006; 43(6):1215-21.

202. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto J-C, Meunier J-Y, Zebaze-Kemleu S, Nyambam R, et al. High Malaria Transmission Intensity in a Village Close to Yaounde, the Capital City of Cameroon. *J Med Entomol.* 2002; 39(2):350-5.
203. Nsanzabana C. Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): Do Not Forget the Partner Drug! *Trop Med Infect Dis.* 2019; 4(1):26.
204. Cyrklaff M, Srismith S, Nyboer B, Burda K, Hoffmann A, Lasitschka F, et al. Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes. *Nat Commun.* 2016; 7(1):1-11.
205. Kavishe RA, Koenderink JB, Alifrangis M. Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. *FEBS J.* 2017; 284(16):2579-91.
206. Mbanefo EC, Ahmed AM, Titouna A, Elmaraezy A, Trang NTH, Phuoc Long N, et al. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017; 7:45963.
207. Taylor SM, Cerami C, Fairhurst RM. Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of *Plasmodium falciparum* malaria pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2013; 9(5):e1003327.
208. Ndam NT, Basco LK, Ngane VF, Ayouba A, Ngolle EM, Deloron P, et al. Reemergence of chloroquine-sensitive pfcr1 K76 *Plasmodium falciparum* genotype in southeastern Cameroon. *Malar J.* 2017; 16(1):130.
209. Moyeh MN, Njimoh DL, Evehe MS, Ali IM, Nji AM, Nkafu DN, et al. Effects of drug policy changes on evolution of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine, and sulphadoxine-pyrimethamine in the South West region of Cameroon. *Malaria Research and Treatment.* 2018; 7071383. <https://www.hindawi.com/journals/mrt/2018/7071383/abs/>
210. Chauvin P, Menard S, Iriart X, Nsango SE, Tchioffo MT, Abate L, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant pfdhfr/pfdhps alleles. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(9):2566-71.
211. St. Laurent B, Miller B, Burton TA, Amaratunga C, Men S, Sovannaroeth S, et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa. *Nat Commun.* 2015; 6:8614.
212. Eboumbou Moukoko CE, Huang F, Nsango SE, Kojom Foko LP, Ebong SB, Epee Eboumbou P, et al. K-13 propeller gene polymorphisms isolated between 2014 and 2017 from Cameroonian *Plasmodium falciparum* malaria patients. *PLoS ONE.* 2019;14(9):e0221895.
213. Conrad MD, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance in Africa: the calm before the storm? *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(10):e338-51.
214. Charman SA, Arbe-Barnes S, Bathurst IC, Brun R, Campbell M, Charman WN, et al. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108(11):4400-5.
215. Phyto AP, Jittamala P, Nosten FH, Pukrittayakamee S, Imwong M, White NJ, 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. USA.* 2016; 16(1):61-9.
216. Macintyre F, Adoke Y, Tiono AB, Duong TT, Mombo-Ngoma G, Bouyou-Akotet M, et al. A randomised, double-blind clinical phase II trial of the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose combination treatment with artefenomel and piperazine in adults and children with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *BMC Med.* 2017; 15(1):181.
 217. Straimer J, Gnädig NF, Stokes BH, Ehrenberger M, Crane AA, Fidock DA. Plasmodium falciparum K13 mutations differentially impact ozonide susceptibility and parasite fitness in vitro. *mBio.* 2017;8(2):e00172-17.
 218. Siriwardana A, Iyengar K, Roepe PD. Endoperoxide drug cross-resistance patterns for Plasmodium falciparum exhibiting an artemisinin delayed-clearance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(11):6952-6.
 219. Yang T, Xie SC, Cao P, Giannangelo C, McCaw J, Creek DJ, et al. Comparison of the exposure time dependence of the activities of synthetic ozonide antimalarials and dihydroartemisinin against K13 wild-Type and mutant Plasmodium falciparum strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(8):4501-10.
 220. Baumgärtner F, Jourdan J, Scheurer C, Blasco B, Campo B, Mäser P, et al. In vitro activity of anti-malarial ozonides against an artemisinin-resistant isolate. *Malar J.* 2017; 16(1):45.
 221. White NJ, Pukrittayakamee S, Phyo AP, Rueangweerayut R, Nosten F, Jittamala P, et al. Spiroindolone KAE609 for falciparum and vivax malaria. *N Engl J Med.* 2014; 371(5):403-10.
 222. Chavchich M, Breda KV, Rowcliffe K, Diagana TT, Edstein MD. The spiroindolone KAE609 does not induce dormant ring stages in Plasmodium falciparum parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(9):5167-74.
 223. Magistrado PA, Corey VC, Lukens AK, LaMonte G, Sasaki E, Meister S, et al. Plasmodium falciparum cyclic amine resistance locus (PfCARL), a resistance mechanism for two distinct compound classes. *ACS Infect Dis.* 2016; 2(11):816-26.
 224. LaMonte G, Lim MY-X, Wree M, Reimer C, Nachon M, Corey V, et al. Mutations in the Plasmodium falciparum cyclic amine resistance locus (PfCARL) confer multidrug resistance. *mBio.* 2016; 7(4):e00696-16.
 225. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin C-S, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J.* 2012; 11(1):270.
 226. Medicines for Malaria Venture. Pyramax®. 2019. <https://www.mmv.org/access/product-maps/pyramax>
 227. Bui Quang P, Huynh Hong Q, Tran Thanh D, Le Thanh D, Nguyen Quang T, Truong Van H, et al. Pyronaridine-artesunate efficacy and safety in uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in areas of artemisinin-resistant falciparum in Viet Nam (2017-2018). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2019. Doi: 10.1093/cid/ciz580 (corrected proof).

228. Okombo J, Fidock DA. Pyronaridine-artesunate shows promise as an effective and well-tolerated treatment for artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2019. Doi: 10.1093/cid/ciz583 (corrected proof).
229. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Safety and efficacy of re-treatments with pyronaridine-artesunate in African patients with malaria: a substudy of the WANECAM randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(2):189-98.
230. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *The Lancet*. 7 avr 2018;391(10128):1378-90.
231. Biot C, Taramelli D, Forfar-Bares I, Maciejewski LA, Boyce M, Nowogrocki G, et al. Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiparasmodial activity. *Mol Pharm*. 2005; 2(3):185-93.
232. Wells TNC, Hooft van Huijsduijnen R. Ferroquine: welcome to the next generation of antimalarials. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(12):1365-6.
233. Daher W, Biot C, Fandeur T, Jouin H, Pelinski L, Viscogliosi E, et al. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar J*. 2006; 5:11.
234. Held J, Supan C, Salazar CLO, Tinto H, Bonkian LN, Nahum A, 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(12):1409-19.
235. Walsh DS, Lell B, Kombila M, Polhemus ME, Ospina Salazar CL, Kremsner PG, et al. Phase 2a, open-label, 4-escalating-dose, randomized multicenter study evaluating the safety and activity of ferroquine (SSR97193) plus artesunate, versus amodiaquine plus artesunate, in African adult men with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 97(2):514-25.
236. World Health Organization; 2008. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Genève.
237. Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine in vitro assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med*. 2015;13:305.
238. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, MacInnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*. 2013;45(6)648-655.
239. Hanboonkunupakarn B, Pluijm RW van der, Hoglund R, Pukrittayakamee S, Winterberg M, Mukaka M, et al. Sequential open-label study of the safety, tolerability, and pharmacokinetic interactions between dihydroartemisinin-piperaquine and mefloquine in healthy thai adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(8)e00060-19.

240. ClinicalTrials.gov. Efficacy, safety, and tolerability of dihydroartemisinin-piperaquine + mefloquine compared to dihydroartemisinin-piperaquine or artesunate-mefloquine in patients with uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02612545>
241. Rohrbach P, Sanchez CP, Hayton K, Friedrich O, Patel J, Sidhu ABS, et al. Genetic linkage of *pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*. 2006; 25(13):3000-11.
242. Aziz MY, Hoffmann K-J, Ashton M. Inhibition of CYP3A by antimalarial piperaquine and its metabolites in human liver microsomes with IVIV extrapolation. *J Pharm Sci*. 2018; 107(5):1461-7.
243. Fontaine F, de Sousa G, Burcham PC, Duchêne P, Rahmani R. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. *Life Sci*. 2000; 66(22):2193-212.
244. Whegang Youdom S, Chiabi A, Basco LK. Monitoring the efficacy and safety of artemisinin-based combination therapies: a review and network meta-analysis of antimalarial therapeutic efficacy trials in Cameroon. *Drugs RD*. 2019; 19(1):1-14.
245. Dama S, Niangaly H, Djimde M, Sagara I, Guindo CO, Zeguime A, et al. A randomized trial of dihydroartemisinin-piperaquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Malar J*. 2018; 17(1):347.
246. Zwang J, Ashley EA, Karema C, D'Alessandro U, Smithuis F, Dorsey G, et al. Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine in falciparum malaria: a prospective multi-centre individual patient data analysis. *Diemert DJ, éditeur. PLoS ONE*. 2009; 4(7):e6358.
247. Doumbe-Belisse P, Ngadjeu CS, Sonhafouo-Chiana N, Talipouo A, Djamouko-Djonkam L, Kopya E, et al. High malaria transmission sustained by *Anopheles gambiae* s.l. occurring both indoors and outdoors in the city of Yaoundé, Cameroon. *Wellcome Open Res*. 2018;3:164.
248. Whegang SY, Tahar R, Foumane VN, Soula G, Gwét H, Thalabard J-C, et al. Efficacy of non-artemisinin- and artemisinin-based combination therapies for uncomplicated falciparum malaria in Cameroon. *Malar J*. 2010; 9:56.
249. Nji AM, Ali IM, Moyeh MN, Ngongang E-O, Ekollo AM, Chedjou J-P, et al. Randomized non-inferiority and safety trial of dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroonian children. *Malar J*. 2015; 14:27.
250. Menard S, Tchoufack JN, Maffo CN, Nsango SE, Iriart X, Abate L, et al. Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates. *Malar J*. 2016; 15(1):572.
251. Maïga-Ascofaré O, May J. Is the A578S single-nucleotide polymorphism in K13-propeller a marker of emerging resistance to artemisinin among *Plasmodium falciparum* in Africa? *J Infect Dis*. 2016; 213(1):165-6.
252. Leang R, Canavati SE, Khim N, Vestergaard LS, Borghini Fuhrer I, Kim S, et al. Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(7):3884-90.

253. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Pyronaridine–artesunate or dihydroartemisinin–piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *The Lancet*. 2018; 391(10128):1378-90.
254. Roth JM, Sawa P, Makio N, Omweri G, Osoi V, Okach S, et al. Pyronaridine–artesunate and artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kenyan children: a randomized controlled non-inferiority trial. *Malar J*. 2018; 17(1):199.
255. Pryce J, Hine P. Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Cochrane Infectious Diseases Group, éditeur. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019; [Http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006404.pub3](http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006404.pub3)
256. Kreidenweiss A, Kremsner PG, Dietz K, Mordmüller B. In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(6):1178-81.
257. Held J, Supan C, Salazar CLO, Tinto H, Bonkian LN, Nahum A, 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(12):1409-19.
258. Walsh DS, Akala HM, Johnson JD, Eyase FL. Inhibitory activity of ferroquine, versus chloroquine, against Western Kenya *Plasmodium falciparum* field isolates determined by a SYBR Green I in vitro assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(6):984-8.
259. Atteke C, Ndong JM, Aubouy A, Maciejewski L, Brocard J, Lébib J, Deloron P.. In vitro susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooue region of Gabon. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51(4):1021-4.
260. Medicines for Malaria Venture. ASAQ Winthrop® (artesunate-amodiaquine). 2019, <https://www.mmv.org/access/products-projects/asaq-winthrop-artesunate-amodiaquine>
261. Hong KB, Hastings I, Kay K, Hodel EM. Evaluating artesunate-amodiaquine deployment, efficacy and safety: an in silico pharmacological model. *bioRxiv*. 2019;567008. <https://doi.org/10.1101/567008>.
262. Thanh NX, Trung TN, Phong NC, Quang HH, Dai B, Shanks GD, et al. The efficacy and tolerability of artemisinin-piperaquine (Artequick®) versus artesunate-amodiaquine (Coarsucam™) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in south-central Vietnam. *Malar J*. 2012; 11:217.
263. Thanh NX, Trung TN, Phong NC, Thien NX, Dai B, Shanks GD, et al. Open label randomized comparison of dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in central Vietnam. *Trop Med Int Health TM IH*. 2009; 14(5):504-11.
264. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann A-C, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun*. 2016; 7(1):1-12.

265. Basco LK, Ringwald P. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in cameroon. XXIV. Trends of in vitro antimalarial drug responses in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(1):20-6.
266. Sasi P, Abdulrahman A, Mwai L, Muriithi S, Straimer J, Schieck E, et al. In vivo and in vitro Efficacy of Amodiaquine against *Plasmodium falciparum* in an Area of Continued Use of 4-Aminoquinolines in East Africa. *J Infect Dis.* 2009; 199(11):1575-82.
267. Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, Hienne R, et al. In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(3):333-9.
268. Djimde AA, Makanga M, Kuhén K, Hamed K. The emerging threat of artemisinin resistance in malaria: focus on artemether-lumefantrine. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13(8):1031-45.
269. World Health Organization. World Malaria Report 2015. [Http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804](http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804)
270. Zhu L, Tripathi J, Rocamora FM, Miotto O, Pluijm R van der, Voss TS, et al. The origins of malaria artemisinin resistance defined by a genetic and transcriptomic background. *Nat Commun.* 2018; 9(1):1-13.
271. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2010.
272. Melsted P, Ntranos V, Pachter L. The Barcode, UMI, Set format and BUStools. *bioRxiv.* 2018; 472571.
273. Lun ATL, Riesenfeld S, Andrews T, Dao TP, Gomes T, Marioni JC, et al. EmptyDrops: distinguishing cells from empty droplets in droplet-based single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* 2019; 20(1):63.
274. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011; 6(7):e21800.
275. Chaorattanakawee S, Lanteri CA, Sundrakes S, Yingyuen K, Gosi P, Chanarat N, et al. Attenuation of *Plasmodium falciparum* in vitro drug resistance phenotype following culture adaptation compared to fresh clinical isolates in Cambodia. *Malar J.* 2015; 14(1):486.
276. Nair S, Li X, Arya GA, McDew-White M, Ferrari M, Nosten F, et al. Fitness costs and the rapid spread of kelch13-C580Y substitutions conferring artemisinin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(9):e00605-18.
277. Tirrell AR, Vendrely KM, Checkley LA, Davis SZ, McDew-White M, Cheeseman IH, et al. Pairwise growth competitions identify relative fitness relationships among artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* field isolates. *Malar J.* 2019; 18(1):295.
278. Otto TD, Gilabert A, Crellen T, Böhme U, Arnathau C, Sanders M, et al. Genomes of all known members of a *Plasmodium* subgenus reveal paths to virulent human malaria. *Nat Microbiol.* 2018; 3(6):687-97.

RÉSUMÉ

Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) sont depuis vingt ans les médicaments de référence pour le traitement du paludisme causé par *Plasmodium falciparum*. Les CTA se composent de deux molécules antipaludiques : un dérivé d'artémisinine à action rapide et brève, et une molécule partenaire à action plus lente mais prolongée. Leur mise en place globale a contribué à la diminution drastique de la mortalité liée au paludisme.

La mondialisation des CTA a permis à de nombreux pays endémiques de tendre vers l'élimination du paludisme. L'accomplissement de cet objectif se heurte cependant à l'émergence de résistances à l'artémisinine et aux composés partenaires. Cette problématique est particulièrement présente au Cambodge, et s'étend maintenant à une grande partie de l'Asie du Sud-Est. La perte de l'efficacité des CTA en Afrique aurait de lourdes conséquences en termes de santé publique, c'est pourquoi des stratégies de surveillance des résistances doivent être mises en place pour pallier à ce risque.

De précédentes études ont permis de mettre en place de nouveaux tests phénotypiques participant à la découverte de marqueurs moléculaires de résistance aujourd'hui utilisés pour la surveillance de l'efficacité des traitements. La première partie de ce travail a visé à mieux définir, en utilisant ces outils, l'épidémiologie de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux CTA en Asie et en Afrique. Nos recherches se sont concentrées sur deux pays stratégiques : le Cambodge, pays à faible transmission mais qui est l'épicentre de l'émergence des résistances aux composés antipaludiques, et le Cameroun, pays à forte transmission d'Afrique centrale, dont la résistance aux CTA n'a pas encore été rapportée. Dans une deuxième partie, de nouvelles options thérapeutiques ont été testées cliniquement et/ou *in vitro* sur des parasites multi-résistants isolés au Cambodge. Enfin, une troisième partie a étudié les mécanismes de résistance à l'artémisinine additionnels aux polymorphismes du gène *Kelch13*, en associant culture *in vitro* à long terme et séquençage ARN de cellules individuelles.

L'ensemble des travaux présentés s'inscrit dans une stratégie de surveillance de la résistance aux antipaludiques au Cambodge et au Cameroun. Les études épidémiologiques des résistances décrites dans cette thèse permettront de mieux adapter les traitements antipaludiques pour limiter la sélection de parasites résistants dans ces deux pays. De nouvelles données concernant les mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance à l'artémisinine ont aussi été apportées. Parmi les nouvelles options thérapeutiques testées, certaines étaient efficaces sur les parasites multi-résistants, et pourraient remplacer les traitements de première ligne actuels en cas d'augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques au Cambodge.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, résistance, Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine, Cambodge, Cameroun, mécanisme, nouvelles options thérapeutiques.

ABSTRACT

Artemisinin-based Combination Therapies (ACT) are the standard treatments for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. ACTs are composed of two antimalarial molecules: a fast-acting artemisinin derivative, and a long-acting partner drug. The global use of this efficient formulation has enabled to reduce malaria-related mortality by sixty percent over the last 20 years.

After ACT introduction, many endemic countries moved into the elimination phase of the disease. However, parasite eradication is still being undermined by the emergence of parasite resistance to artemisinin and partner drugs. *Plasmodium falciparum* resistance issue is particularly present in Cambodia. The global spread of resistance to ACT would be a public health disaster. Therefore, new resistance control strategies have to be set up. Those strategies include: i) a performant diagnosis of resistance ii) the epidemiologic study of resistance iii) a better understanding of cellular mechanisms involved in resistance and finally iv) new therapeutic options discovery.

Previous studies have designed new phenotypic assays to detect resistance, which helped to discover molecular markers that are now used for global drug resistance surveillance. The first part of this work aimed, using those tools, to better define the epidemiology of ACT resistance in Asia and Africa focusing on two strategic countries: Cambodia, a low-transmission country, which is the epicentre of drug resistance emergence, and Cameroon, a high-transmission country where resistance to ACT has not yet been reported. The second part focused on testing of new antimalarial compounds, clinically and/or *in vitro*, on multi-resistant parasites collected in Cambodia. Finally, the last part explored the mechanism of artemisinin resistance using long term *in vitro* culture and Single Cell RNA sequencing.

The presented work is part of the global strategy for reduction of malaria prevalence. Through a better understanding of the epidemiology of resistant *P. falciparum* in Cambodia and Cameroon, this work helped to survey and adapt current treatments to avoid selection and spread of drug-resistant parasites. Moreover, new interesting data on artemisinin resistance mechanism were also generated. Among the new antimalarial compounds tested, some were efficient and could be considered as new therapeutic options to replace the current first-line treatment in Cambodia in case of increasing treatment failures.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, resistance, Artemisinin-based Combination Therapies, Cambodia, Cameroon, mechanism, new therapeutic options