



**HAL**  
open science

# Sélection des parasites porteurs de mutations associées à la résistance aux antipaludiques recommandés par l’OMS au cours la prise en charge du paludisme

Atikatou Mama

## ► To cite this version:

Atikatou Mama. Sélection des parasites porteurs de mutations associées à la résistance aux antipaludiques recommandés par l’OMS au cours la prise en charge du paludisme. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5059 . tel-03962891

**HAL Id: tel-03962891**

**<https://theses.hal.science/tel-03962891>**

Submitted on 30 Jan 2023

**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 de Paris

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (MTCI ED 563)

UMR 261 – Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes, système de santé et  
transition épidémiologique (MERIT)

Institut Cochin – Biologie Comparative des APICOMPLEXES

## **Sélection des parasites porteurs de mutations associées à la résistance aux antipaludiques recommandés par l’OMS au cours de la prise en charge du paludisme**

Par

**Atikatou MAMA**

Thèse de doctorat en parasitologie

Dirigée par :

Nicaise TUIKUE NDAM et Frédéric ARIEY

Présentée et soutenue publiquement le 17 Décembre 2021

Devant un jury composé de :

**Dr. Sandrine Houzé** : Professeure des Universités, Université de Paris, Examinatrice

**Dr Aurore Hounto Ogouyemi** : Professeure des Universités, Université d’Ab-Calavi, Examinatrice

**Dr. Agnès Aubouy** : Chargée de recherche, Université de Toulouse, Rapporteur

**Dr. Arthur Talman** : Chargé de recherche, Université de Montpellier, Rapporteur

**Dr. Nicaise Tuikue Ndam** : Directeur de recherche, Université de Paris, Directeur de thèse

**Dr. Frédéric ArieY** : Professeur des Universités, Université de Paris, Directeur de thèse

## Résumé

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par diverses espèces de *Plasmodium* ; *P. falciparum* étant l'espèce la plus répandue et responsable des cas mortels de la maladie chez l'homme. Les enfants âgés de moins de cinq ans et les femmes enceintes représentent les couches les plus vulnérables de la population en raison de la faiblesse de l'immunité protectrice chez les enfants et de la susceptibilité accrue des femmes enceintes primigestes au paludisme placentaire. En l'absence d'un vaccin homologué par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour lutter contre la maladie, une stratégie de lutte définie en trois axes a été mise en œuvre pour aider à l'élimination du paludisme. Il s'agit de la lutte anti-vectorielle, le diagnostic et le traitement (l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDRs) et combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA)) et enfin, le traitement préventif intermittent (TPI) pour les populations à risque. La mise en place globale de ces stratégies a contribué à la diminution importante de la mortalité et la morbidité liées au paludisme. Cependant, ces efforts se heurtent à l'émergence et à la propagation de la résistance parasitaire aux traitements tels que la sulfadoxine pyriméthamine (SP) recommandée dans le TPI ainsi que l'artémisinine et ses composés partenaires (recommandés en première intention dans le traitement du paludisme).

Cette thèse vise à utiliser les technologies de séquençage, pour évaluer la pression de sélection exercée par deux traitements recommandés par l'OMS en zone d'endémie palustre (le TPI et les CTAs).

La première partie de ce travail s'est déployée sous deux sous études. Une première sous étude a permis de confirmer les effets bénéfiques de la prise d'un nombre supérieur ou égal à 3 doses de traitement préventif intermittent avec la sulfadoxine pyriméthamine (TPI-SP) par les femmes enceintes sur le poids de naissance. La deuxième sous étude quant à elle montrait que cette prise de doses augmentées de TPI-SP exerçait une sélection sur les parasites en favorisant ceux porteurs de mutations associées à la résistance à cette combinaison thérapeutique. L'essentiel des travaux de cette partie a été menée au Ghana, pays endémique au paludisme et qui très tôt a adopté et entrepris la mise en œuvre de la nouvelle politique d'utilisation du TPI-SP qui consiste en une prise mensuelle de la SP après le troisième mois de grossesse.

La deuxième partie de ce manuscrit de thèse a abordé le séquençage et l'analyse du génome entier des isolats de parasites collectés chez les enfants impaludés avant et après traitement par les dérivés d'artémisinine. Une méthode de filtration du sang consistant à dépler le sang total de l'ADN humain afin d'améliorer la qualité des résultats de séquençage d'ADN en utilisant la technologie illumina, a été

mise en place. Cette méthode de filtration a été réalisée sur des isolats collectés chez des enfants souffrant de paludisme simple et de paludisme grave au Bénin. Cette étude a démontré que les isolats étaient identiques avant et après traitement indépendamment du type de paludisme et de la zone d'étude. Globalement, aucune mutation ni amplification de gènes n'a été observé. Nous avons affiné notre étude en utilisant la méthode du targeted amplicon deep sequencing (TADs) sur deux gènes *pfdhfr* et *pfk13*, dont certaines mutations sont connues pour être associées respectivement à la résistance à la pyriméthamine et à l'artémisinine. Nous avons ainsi pu montrer la sélection de sous populations parasitaires porteurs de mutations associées à la résistance aux dérivés d'artémisinine quelques heures seulement après un traitement aux CTAs.

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrit dans une stratégie de surveillance de la résistance aux antipaludiques pouvant permettre de mieux adapter les traitements antipaludiques afin de limiter la sélection de parasites résistants.

**Mots clés** : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, paludisme pendant la grossesse, TPI-SP, résistance, sélection, mutation, sulfadoxine-pyriméthamine, artémisinine, CTA, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfk13*

## Abstract

Malaria is a parasitic disease caused by different *Plasmodium* species, with *P. falciparum* being the most common and responsible for fatal cases of the disease in human. Children under five years of age and pregnant women are the most vulnerable segments of the population due to the low protective immunity in children and the increased susceptibility of primigravid pregnant women to placental malaria. In the absence of a vaccine approved by the World Health Organisation (WHO) to fight the disease, a certain number of control strategies have been implemented to help prevent malaria. These are vector control, diagnosis and treatment (the use of rapid diagnostic tests (RDTs) and artemisinin-based combination therapies (ACTs)) and finally, intermittent preventive treatment (IPTp) for at-risk populations. The overall implementation of these strategies has contributed to a significant reduction in malaria-related mortality and morbidity. However, these efforts are hampered by the emergence and spread of parasite resistance to treatments such as the sulfadoxine pyrimethamine (SP) recommended for IPT and artemisinin and its partner compounds (recommended as first-line treatment for malaria).

This thesis aims to use sequencing technologies to evaluate the selection pressure exerted by two treatments recommended by the WHO in malaria endemic areas (IPTp and ACTs).

The first part of this work was carried out in two sub-studies. The first sub-study confirmed the beneficial effects on birth weight of taking three or more doses of intermittent preventive treatment with pyrimethamine sulfadoxine (IPTp-SP) by pregnant women. The second sub-study showed that the increased doses of IPTp-SP exerted a selection effect on the parasites by favouring those carrying mutations associated with resistance to this therapeutic combination. Most of the work in this section was carried out in Ghana, a malaria endemic country that adopted early the IPTp-SP new policy, which consists of a monthly uptake of SP after the third month of pregnancy.

The second part of this thesis manuscript addressed the sequencing and whole genome analysis of parasite isolates collected from malaria-affected children before and after treatment with artemisinin derivatives. To help achieve the objectives, a blood filtration method consisting of depleting whole blood of human DNA in order to improve the quality of the DNA sequencing results using illumina technology, was implemented. This filtration method was performed on isolates collected from children suffering from simple and severe malaria in Benin. To help achieve the objectives, a blood filtration method consisting of depleting whole blood of human DNA in order to improve the quality of DNA sequencing results using illumina technology has been implemented. The work in this second part was carried out

using samples collected in Benin from children with uncomplicated and severe malaria. This study showed that the isolates were identical before and after treatment regardless of the type of malaria and the study area. Overall, no mutations or gene amplifications were observed. We refined our study by using the targeted amplicon deep sequencing (TADs) method on two genes: *pfdhfr* and *pfk13*, some of whose mutations are known to be associated with pyrimethamine and artemisinin resistance respectively. We were thus able to show the selection of parasite sub-populations carrying mutations associated with resistance to artemisinin derivatives only a few hours after treatment with CTAs.

The work presented in this manuscript is part of a strategy to monitor antimalarial drug resistance, which may allow better adaptation of antimalarial treatments to limit the selection of resistant parasites.

**Key words:** Malaria, *P. falciparum*, malaria in pregnancy, IPTp-SP, resistance, selection, mutation, sulfadoxin-pyrimethamin, artemisinin, ACT, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfk13*

*A feu ma mère Adiza SAMBO*  
*Tu as tant voulu voir ce jour ! Hélas, tu n'es plus là*  
*Mais je sais que de là où tu es, tu es fière de moi.*  
*Puisses-tu enfin reposer en paix*  
*Avec tout mon amour !*

## Remerciements

Au terme de ce travail, je voudrais rendre grâce à Dieu.

J'adresse ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, les Drs Nicaise Tuikue Ndam et Frédéric Arieu pour avoir dirigé ce travail, leur disponibilité, leur soutien sans faille et toute la confiance accordée en ma personne.

J'exprime ma reconnaissance aux Drs Philippe Deloron et André Garcia, et aux Prs Gordon Langsley et Abraham Anang pour m'avoir accueilli au sein de leur unité et laboratoire respectif.

Je remercie les membres du jury: les Prs Sandrine Houzé et Aurore Hounto Ogouyemi ainsi qu'aux Drs Agnes Aubouy et Arthur Talman, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

A toute l'équipe Arieu de l'Institut Cochin : Yera Helene, Robert Ménard, Ulrich Bockelmann, Bizebard Thierry, Laurence Momeux, Kokoura Mensah, Ismail Cissé, Schraeder Christian, Madison Saintpierre et Mariama Bah. Merci pour les moments partagés.

Merci à toute l'équipe de l'UMR261/Paris pour votre accueil chaleureux spécialement à Rachida Tahar pour m'avoir permis de travailler sur son projet, ainsi qu'à Isabelle Gaugué, Anais, Laura et Sayeh.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe de l'UMR261/Cotonou.

Aux Drs Sem Ezinmegnon et Tatiana Hountohotegbé, vous avez été mon soutien de chaque jour à travers les moments de joie et de tristesse partagés. Merci d'avoir été là pour moi.

Au Dr Shahin Tajeri, Merci pour ta présence discrète et tes précieux conseils.

Au Dr Romain Coppée, merci pour tes précieux conseils, tes mots gentils à chaque fois que je baissais les bras. Ne change surtout pas.

Aux Drs Leonidas Topklonou, Gino Agbota et Cornelia Hounkonnou, merci pour les moments de convivialité.

Un coucou à la « communauté » du bâtiment Mechain. Vous vous reconnaissez ! Vous avez été incroyable.

Aux collègues de Cotonou : Firmine, Aurax, Rafiou, Bertin, Darius, Manfred, Sévérin, Joseph, Ginette, Sophie, Honoré, Erasme, Pépin, Justine merci pour les bons moments.

Aux collègues du Ghana : Charity, Naa, spooky, Eric, Belinda et Kakra. A l'équipe de parasitologie et d'immunologie du NMIMR, merci pour le travail accompli ensemble.

Mes sincères remerciements aux médecins, sages-femmes, mères et aux parents ayant accepté de participer aux différentes études développées dans ce travail.

Je remercie le Labex Parafrap pour m'avoir accordé ce financement de thèse.

J'adresse ma sincère reconnaissance à l'école doctorale Médicament Toxicologie Chimie et Imagerie et à l'université de Paris, pour avoir accepté mon inscription.

A mes amis Armel, Jeanne, Inès, Nicole, Jessica, Tècle, Bernice, Kassira, Marie, Zaki, Sawab et Rico votre soutien et votre amitié m'ont aidé à avancer.

A la famille KANEHO, merci pour votre soutien et affection.

A ma petite « maman » Elvire Quenum et sa fille Audrey Dogbe, au couple MEDENOU et leur fils Merick ainsi qu'à la famille SARRE, MERCI. Vous m'avez permis de vivre l'ambiance familiale ici en France.

A toute ma famille, merci pour votre soutien.

A mon père et ma feu mère, merci pour tous les sacrifices consentis. Sans vous, je n'aurais pas pu être là où je suis aujourd'hui.

A mes frères et sœur, Adama, Zoulfa, Karima, Faysal, Mounirou et Zoulkaneini et leurs familles respectives, vous avez toujours été d'un soutien sans faille.

A Wuissem avec tout mon amour !

## Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AP	: Accouchement Prématuro
ARN	: Acide Ribonucléique
ATS	: Acidic Terminal Sequence (C-terminal intracellulaire de nature acide)
AVS	: Antigènes variants de surface
CERPAGE	: Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance
CHD	: Centre Hospitalier Départemental
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CSCom	: Centre de Santé Communautaire
CTA	: Combinaison thérapeutique à base d'Artemisinine
CI50	: Concentration inhibitrice 50
CSA	: Chondroïtine Sulfate A
°C	: Degré celsius
Covid 19	: Coronavirus Disease 2019
CytB	: CytochromeB
CytC	: Cytochrome C
CQ	: Chloroquine
DBL	: Duffy Binding Like
DDT	: Dichlorodiphényltrichloroéthane
DHA	: Dihydroartemisinine
DHFR	: Dihydrofolate reductase
DHPS	: Dihydropteroase synthetase
dNTPs	: Deoxynucleotide triphosphates
EDTA:	: Éthylène diamine tétra-acétique
EPCR:	: Endothelial Protein C Receptor (Récepteur endothélial de la protéine C)
FPN	: Faible Poids de Naissance
GLURP	: Glutamate Rich Protein (Protéine riche en glutamate)
Hb	: Hemoglobine
HRP2	: Histidin Riche Proteine 2 (Protéine riche en histidine)

IM	: Intramusculaire
IV	: Intraveineuse
LDH	: Lactatedéshydrogénase
MFQ	: Mefloquine
MII	: Moustiquaire Imprégnée d’Insecticide
MSP1	: Merozoite Surface Protein-1 (Protéine de surface merozoites du bloc 1)
MSP2	: Merozoite Surface Protein-2 (Protéine de surface merozoites du bloc 2)
MSP3	: Merozoite Surface Protein-3 (Protéine de surface merozoites du bloc 3)
NMIMR	: Noguchi Memorial Institut for Medical Research
OMS	: Organisation Mondiale de la Sante
<i>P.falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfemp1</i>	: Protéine membranaire 1 des érythrocytes <i>P. falciparum</i>
<i>Pfmdr1</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> multidroque resistant
<i>Pfk13</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> domaine propeller kelch 13
PPQ	: Piperaquine
PCR	: Polymerase Chain Reaction
<i>Pfcr1</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquine Resitance Transporter
<i>Pfdhps</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroase synthetase
<i>Pfdhfr</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfcytb</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i> cytochrome b
Pb	: Paire de Base
PNLP	: Politique Nationale de Lutte contre le Paludisme
QN	: Quinine
RCI	: Retard de Croissance Intra-utérin
RSA0-3h	: Essais de survie du stade en anneau (Ring-stage Survival Assays)
SP	: Sulfadoxine Pyrimethamine
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme nucléotidique)
PAM	: Pregnancy Associated Malaria (Paludisme Associé à la grossesse)
TDR	: Test Dignostic Rapide

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Carte des pays avec des cas de paludisme en 2000 et leur situation en 2019 <sup>3</sup> .....	9
<b>Figure 2</b> Adaptée de Jensen, A. R. et al, 2020 : Cycle de vie de Plasmodium chez l'homme et le moustique <sup>37</sup> .....	12
<b>Figure 3</b> : Interactions caractéristiques de la séquestration des érythrocytes infectés par P. falciparum dans les micro-vaisseaux <sup>39</sup> .....	16
<b>Figure 4</b> : Adaptée de Doritchamou, J. Y. A. et al, 2019 : Différentes structures architecturales de VAR2CSA <sup>46</sup> .....	17
<b>Figure 5</b> : Evolution de la mortalité au fil des années .....	24
<b>Figure 6</b> : Représentation du coût du génome en fonction des année <sup>93</sup> .....	34
<b>Figure 7</b> : Les différentes étapes du NGS .....	36
<b>Figure 8</b> : Méthodes d'enrichissement de l'échantillon en ADN cible <sup>97</sup> .....	37
<b>Figure 9</b> : Schéma du principe de séquençage sur une plateforme MiSeq (Illumina) <sup>97</sup> .....	38
<b>Figure 10</b> : Couverture et profondeur de séquençage <sup>97</sup> .....	40
<b>Figure 11</b> : Rapport mondial sur le paludisme en 2018 ; Profil épidémiologique du Ghana.....	53
<b>Figure 12</b> : Sites d'étude du projet MAHEVA au Ghana <sup>126</sup> . .....	58
<b>Figure 13</b> : Rapport mondial sur le paludisme en 2018 ; Profil épidémiologique du Bénin <sup>133</sup> .....	87
<b>Figure 14</b> : Carte du Bénin et des deux sites sur lesquels la collecte des échantillons filtrés a été effectuée. ....	93

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Critères de gravité du paludisme OMS, 2000. Mise à jour 2017 des RPC 2007, SPILF ....	14
<b>Tableau 2</b> : Réactifs utilisés pour un mélange réactionnel pour les isolats du Ghana .....	61
<b>Tableau 3</b> : Amorces utilisées lors du génotypage <i>pfdhfr</i> et <i>pfdhps</i> pour les isolats du Ghana.....	61
<b>Tableau 4</b> : Conditions utilisées pour l'amplification <i>pfdhfr</i> et <i>pfdhps</i> pour les isolats du Ghana.....	61
<b>Tableau 5</b> : Volume utilisé pour l'amplification d'un échantillon pour les isolats du Bénin .....	97
<b>Tableau 6</b> : Conditions d'amplification des différentes PCR pour les isolats du Bénin.....	97
<b>Tableau 7</b> : Différentes séquences d'amorces utilisées pour les isolats du Bénin .....	97

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract .....	iii
Remerciements.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux.....	xi
Introduction.....	1
Partie I - Revue Bibliographique sur le paludisme et le séquençage à haut-débit.....	5
1.1. Généralités sur le paludisme .....	6
1. Historique, espèces pathogènes et distribution géographique .....	6
1.1.1.1. Historique.....	6
1.1.1.2. Espèces pathogènes.....	8
1.1.1.3. Distribution géographique.....	9
1.1.2. Cycle de vie de <i>P. falciparum</i> .....	10
1.1.3. Physiopathologie du paludisme à <i>P. falciparum</i> .....	12
1.1.3.1. La protéine VAR2CSA .....	16
1.1.4. Stratégie de lutte contre le paludisme .....	17
1.1.4.1. Paludisme et Prévention.....	18
1.1.4.1.1. Lutte antivectorielle .....	18
1.1.4.2. Paludisme: Diagnostic et prise en charge.....	19
1.1.4.2.1. Diagnostic .....	19
1.1.4.2.2. Prise en charge et traitement .....	20
1.1.4.3. Menaces biologiques liées à la prise en charge du paludisme .....	23

1.1.4.3.1.	Délétion des gènes <i>pfhrp2/3</i> du parasite .....	23
1.1.4.3.2.	Résistance aux antipaludiques.....	23
1.1.4.3.3.	Caractérisation de la résistance à l'artémisinine et la découverte d'un déterminant moléculaire de la résistance aux dérivés d'artémisinine : le gène <i>pfk13</i> .....	25
1.1.4.4.	Vaccins antipaludiques.....	27
1.2.	Le séquençage à haut débit .....	28
1.2.2.	Séquençage de première, deuxième et troisième génération .....	29
1.2.2.1.	Séquençage de première génération .....	29
1.2.2.1.1.	La méthode de Maxam et Gilbert.....	29
1.2.2.1.2.	La méthode de Sanger .....	30
1.2.2.2.	Séquençage de deuxième génération .....	30
1.2.2.2.1.	Solexa/Illumina .....	31
1.2.2.3.	Séquençage de troisième génération .....	32
1.2.3.	Intérêt et coût du séquençage.....	33
1.2.4.	Séquençage en pratique et Changement d'échelle pour les analyses en laboratoire .....	34
1.2.4.1.	Séquençage en pratique.....	35
1.2.4.1.1.	Construction des librairies.....	36
1.2.4.1.2.	Séquençage des librairies .....	38
1.2.4.1.3.	Traitement informatique des données brutes .....	39
1.2.4.1.4.	Profondeur et couverture, les deux paramètres clés du NGS.....	39
1.2.4.1.5.	Interprétation biologique des données .....	40
1.2.4.2.	Séquençage et Génome de <i>P. falciparum</i> .....	40
1.2.4.3.	Ressources génomiques de <i>Plasmodium</i> .....	41
1.2.4.3.1.	PlasmoDB .....	42

1.2.4.4.	Changement d'échelle pour les analyses en laboratoire : Identification des moléculaires associés à la résistance à quelques antipaludiques.....	42
1.2.4.5.	Taux de mutation des gènes d'intérêt.....	44
1.2.4.5.1.	Concept de la sélection par pression médicamenteuse .....	44
	Partie II-Relation, contexte et objectif de la thèse .....	46
	Partie III-Paludisme dans la zone Afrique de l'Ouest : Cas du Ghana et du Bénin.....	50
	Organisation de la thèse en alternance.....	51
	Chapitre 1-Paludisme au Ghana: Cas pratique du projet MAHEVA.....	52
3.1.1.	Justification du choix du Ghana.....	52
3.1.1.1.	Paludisme au Ghana.....	52
3.1.1.1.1.	Système sanitaire du Ghana .....	53
3.1.1.1.2.	Prise en charge du paludisme au Ghana.....	54
3.1.1.2.	Cas pratique du projet MAHEVA.....	56
3.1.1.2.1.	Description du Projet MAHEVA .....	56
3.1.1.2.2.	Echantillonnage.....	58
3.1.1.2.3.	Génotypage des isolats ghanéens .....	59
3.1.1.3.	Résultats .....	62
3.1.1.4.	Difficultés rencontrées .....	85
	Chapitre 2- Paludisme au Bénin: Cas pratique du projet BIOCER .....	86
3.2.1.1.	Paludisme au Bénin.....	86
3.2.1.1.1.	Système sanitaire du Bénin .....	87
3.2.1.1.2.	Prise en charge du paludisme au Bénin.....	89
3.2.2.2.	Cas pratique du projet BIOCER.....	91
3.2.1.2.1.	Description du Projet.....	91

3.2.1.2.2. Déroulement de l'étude .....	93
3.2.2.3. Résultats .....	98
Partie IV: Discussion générale et conclusion.....	148
Références bibliographiques .....	155

## Introduction

Le paludisme est une maladie parasitaire, potentiellement mortelle, causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*<sup>1</sup>. Parmi les six espèces parasitaires infectant l'homme, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et est responsable des formes cliniques graves de la maladie. Ce parasite est transmis par les moustiques femelles du genre *Anopheles*. Géolocalisée dans les zones tropicales et subtropicales, cette affection demeure un problème majeur de santé publique pour les pays d'endémie palustre, si l'on tient compte du lourd fardeau économique qu'elle impose aux populations sans compter les systèmes de santé souvent déficient en matériel et en personnel.

Le fardeau que représente cette maladie reste encore aujourd'hui très élevé avec 229 millions de cas de paludisme et 409 000 décès estimés en 2019 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS)<sup>2</sup>. Quatre-vingt-quatorze pour cent (94%) de ces décès sont attribués à l'Afrique subsaharienne et parmi eux, 67% représentent des enfants âgés de moins de cinq ans<sup>3</sup> (OMS, 2020). Le nombre de cas de paludisme estimé au Ghana est de 4 911 921 dont 11 161 décès. Une tendance similaire s'observe également au Bénin avec 4 799 544 cas de paludisme et 7 037 décès.

Dans les régions de forte endémicité palustre comme le Ghana et le Bénin par exemple, certains groupes de population sont plus susceptibles, et courent un risque considérablement plus élevé, de contracter la maladie et de développer un paludisme grave. Il s'agit notamment des enfants âgés de moins de cinq ans et des femmes enceintes avec des conséquences telles qu'une anémie maternelle et infantile, un risque accru de naissances prématurées et un faible poids de naissance qui à leur tour sont associés à un risque élevé de mortalité infantile<sup>4,5</sup>.

Afin de protéger ces tranches vulnérables de la population et de lutter contre la maladie, nombreux sont les moyens mis en place et qui ont abouti à une diminution drastique des taux d'incidence du paludisme au niveau mondial et en particulier en Afrique, ces quinze dernières années. Les progrès remarquables observés dans cette lutte sont le résultat d'une intensification des mesures et stratégies de lutte associée à une augmentation sans précédent des moyens financiers publics et privés<sup>6</sup>. Les stratégies de lutte et de contrôle du paludisme mises en place peuvent être classées en trois groupes. Il s'agit :

i) de la lutte anti-vectorielle qui consiste en l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) et l'aspersion intra-domiciliaire d'insecticide à effet rémanent pour « Indoor Residual Spraying (IRS) » ;

ii) du diagnostic simplifié par l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDR) et du traitement qui consiste en l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs),

iii) des traitements préventifs intermittents (TPI) pour les populations à risque que représentent les femmes enceintes et les enfants âgés de moins de cinq ans<sup>6,7</sup>.

Bien que ces avancées soient considérables, elles restent toutefois fragiles, en raison du développement incessant de la résistance des parasites aux antipaludiques et de l'extension progressive de la résistance des moustiques aux insecticides associées au manque de moyen financier des systèmes de santé des pays endémiques souvent à faible ressource économique.

Au fil du temps, *P. falciparum* a développé une résistance à plusieurs antipaludiques à commencer par la chloroquine (CQ), autrefois utilisée comme traitement curatif de première intention. La résistance à la CQ fut observée pour la première fois en 1957 en Asie du Sud Est et s'est ensuite répandue en Afrique au cours des années 1970<sup>8</sup>. La molécule fut remplacée par la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP), mais dès les années 1980, la résistance à la SP a suivi le même processus d'expansion que la CQ (émergence en Asie du sud-est et diffusion puis envahissement de toute la zone endémique africaine). A la suite de travaux des chercheurs chinois, une nouvelle molécule a montré une efficacité thérapeutique remarquable contre *P. falciparum* : l'artémisinine. L'artémisinine ou ses dérivées semi-synthétiques (telles que l'artésunate, la dihydroartémisine (DHA), etc.) seront introduites<sup>9,10</sup> d'abord dans les années 90 en Asie du sud-est puis plus largement dans les années 2000 en Afrique et ce, toujours en association avec d'autres molécules afin de limiter les risques de résistance (Traitement combinés à base de dérivés d'artémisinine). A partir de ce moment, la SP ne sera alors recommandée qu'en traitement préventif intermittent (TPI), notamment chez la femme enceinte en raison de sa sûreté, avec une à deux doses à partir du second trimestre de la grossesse (OMS 2002). En 2012, l'OMS a revu sa politique d'utilisation de la SP à la suite de nombreuses études ayant démontré que l'augmentation du nombre de prises de SP était corrélée à une meilleure protection du paludisme chez la femme enceinte<sup>11-13</sup>. Cette nouvelle politique consiste désormais à une prise mensuelle de SP à partir du 4<sup>ème</sup> mois de grossesse<sup>14</sup>. Les bases moléculaires de la résistance à la SP sont bien définies : il s'agit d'une série de mutations ponctuelles apparaissant sur la dihydrofolate reductase (*pfdhfr*) et la dihydroptéroate synthase (*pfdhps*). Ainsi le séquençage de ces deux gènes permet, à eux seuls, d'identifier le niveau potentiel de résistance des parasites à la SP et de surveiller leur expansion dans la population.

Pour éviter le développement de la résistance aux dérivés de l'artémisinine, l'OMS a banni son utilisation en monothérapie en dehors des premiers jours de traitement des formes graves. Cependant,

l'on a assisté au début des années 2000 à la diminution de l'efficacité de cette molécule dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* en Asie du Sud-Est<sup>15,16</sup>. Cette résistance supposée a été mise en évidence grâce à un suivi clinique de patients qui a montré une augmentation du temps de clairance des parasites dans une cohorte de patients Cambodgiens. Cette approche clinique était toutefois très lourde à mettre en place logistiquement, et rapidement une méthodologie de phénotypage in vitro / ex vivo a été développée. Ce phénotypage nommé « Ring-stage Survival Assay », car il consiste à évaluer la capacité des formes jeunes du parasite (Ring) à survivre à une pression courte d'une dose unique de DHA ; a permis de pouvoir réaliser de manière plus simple la détermination de cette résistance<sup>17</sup>. Grâce au développement des outils de génotypage complet des parasites et à la détermination précise du phénotype de résistance, il a été possible de déterminer la base moléculaire de cette résistance particulière. Il s'agit d'une série de mutations qui affectent une zone particulière d'une protéine parasitaire de type kelch (*Pfk13*). Cette découverte majeure, a fourni une base pour détecter rapidement les formes résistantes du parasite aux dérivés d'artémisinine et cartographier leur distribution. Ainsi, on a pu suivre l'évolution de la résistance à l'artémisinine, initialement rapportée tout d'abord dans l'ouest du Cambodge<sup>18,19</sup> et qui s'est propagée ensuite dans presque toute l'Asie. Si jusqu'alors, aucune preuve de la présence de ces parasites n'avait été notifiée en Afrique, des études menées récemment ont montré l'émergence spontanée de la résistance à l'artémisinine en Afrique, en particulier au Rwanda<sup>20</sup> et en Ouganda<sup>21</sup>.

Les dérivés de l'artémisinine sont à la base de toutes les combinaisons médicamenteuses antipaludiques de première intention dans les zones d'endémie. L'émergence de la résistance à ces derniers en Afrique de l'Est relance la crainte de son expansion à l'ensemble des zones d'endémie palustre qui pourrait conduire ainsi à une impasse thérapeutique. Il est donc primordial d'identifier très tôt les sous populations parasitaires émergentes portant des mutations associées à ces phénotypes de résistance pour permettre la mise en place de stratégies de lutte adaptées.

Si, par le passé, l'émergence des résistances associées à l'utilisation des médicaments antipaludiques sont apparues alors que le monde scientifique disposait de très peu de moyens pour les détecter, les quantifier et surtout comprendre leur apparition et origine, cela n'est plus le cas aujourd'hui. Car des avancées notables ont été faites ces dernières années avec notamment le développement des techniques de séquençage à haut débit, qui ont permis de définir des outils performants pour l'identification de marqueurs moléculaires et la caractérisation des conditions d'émergence et de diffusion de la résistance aux dérivés de l'artémisinine.

Cette thèse vise à utiliser les technologies de séquençage, pour évaluer la pression de sélection exercée par les deux traitements recommandés par l’OMS en zone d’endémie palustre (le TPI-SP et les CTA). Deux cohortes ont été utilisées à cet effet.

La première cohorte, constituée de femmes enceintes recrutées au Ghana suivant le protocole TPI-SP, nous a permis d’évaluer l’influence de ce traitement sur la sélection de population parasites résistantes à la SP.

La seconde cohorte incluant des enfants âgés de moins de cinq ans recrutés au Bénin, traités soit par artésunate seul (formes graves) soit par l’artémether-lumefantrine (formes simples), nous a permis d’évaluer la capacité des dérivés de l’artémisinine à sélectionner des populations parasites minoritaires présentant des mutations dans le gène *pfk13* dès les premières heures du traitement.

**Partie I - Revue Bibliographique sur le paludisme et le  
séquençage à haut-débit**

## 1.1. Généralités sur le paludisme

### 1. Historique, espèces pathogènes et distribution géographique

#### 1.1.1.1. Historique

Le paludisme est l'une des affections les plus mortelles et les plus anciennement documentée de l'histoire de l'humanité. Selon les écrits rapportés de différentes périodes de notre histoire, le paludisme était présent dans la plupart des grandes civilisations humaines et de nombreuses hypothèses évoquent la présence de cette maladie il y a plus de 50000 ans déjà<sup>22</sup>.

On retrouve les premières traces écrites évoquant les symptômes du paludisme au Moyen-Âge et dans l'Antiquité. D'après « Canon de la Médecine Chinoise », la maladie était symbolisée sous la forme d'un dragon à trois têtes représentant chacune l'une des phases de l'accès palustre : la première tient un marteau symbolisant les maux de tête, la seconde porte un seau d'eau glacée symbolisant les frissons et la dernière un diadème de fer rouge symbolisant enfin les fièvres de la maladie<sup>23</sup>. Par la suite, dans l'Égypte ancienne, le paludisme a été notamment décrit dans les papyrus d'Ebers datant de 1550 avant Jésus-Christ évoquant le rôle du moustique et des eaux stagnantes dans la contamination par la maladie (Malaria: A plague of ancient Egypt).

Puis des écrits trouvant leurs origines dans les Védas en Inde font référence aux symptômes de la maladie, notamment le Susruta Samhitâ (le Samhitâ est défini comme un ouvrage) représentant l'un des plus anciens traités de science médicale connus. Des ouvrages de médecine tels que le Bhela Samhitâ et le Charaka Samhitâ décrivent le paludisme à travers des accès de fièvres tierces et quartes, attribuées à la colère de Shiva.

Enfin, dans le bassin méditerranéen, de nombreux écrits retracent également des vagues de paludisme ayant ravagé les populations locales. Il apparaît clairement que si l'homme ne connaît pas encore la maladie à cette époque, il l'associe déjà aux moustiques et aux eaux stagnantes.

Malgré les différentes contributions faites par ces prédécesseurs, on estime qu'Hippocrate (460 à 370 avant Jésus-Christ), a été le premier à décrire les signes cliniques du paludisme, notamment la fièvre intermittente qu'il avait associé à certaines conditions climatiques et environnementales<sup>24</sup>.

Quelques siècles auparavant, l'Europe était vraisemblablement confrontée à la même situation que celle que vit l'Afrique aujourd'hui en termes de mortalité et de morbidité. On estime qu'au début du XVIe siècle, ce sont les colons européens et leurs esclaves qui ont probablement amené le paludisme sur

le continent américain. Cette hypothèse a été confirmée par une étude datant de 2012 sur des marqueurs génétiques de milliers d'échantillons de *P. falciparum* et qui confirme l'origine africaine du parasite en Amérique du Sud<sup>25</sup>.

Plusieurs siècles plus tard (XVIIIe et XIXe siècles), sur la base des observations faites par Meckel Le jeune, Alphonse Laveran (en 1880) observa et identifia pour la première fois le protozoaire responsable du paludisme dans les globules rouges de 44 personnes souffrant de la maladie. Celui-ci sera dénommé en 1885, *Plasmodium*. Cette découverte lui vaudra d'ailleurs l'attribution du prix Nobel de médecine en 1907. Puis, ce fut au tour de Marchiafava, Celli et Golgi, qui distinguèrent trois espèces parasites sanguicoles de l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*. Une dizaine d'années plus tard (1898), Ronald Ross, prouvait que le paludisme est transmis par piqûre d'un moustique appelé Anophèle. En 1899, Grassi, se basant sur les travaux de Ross démontra que la présence du moustique était nécessaire dans le cycle vital du *Plasmodium*. Grassi, Giuseppe Bastianelli et Amico Bignami décrivent alors le cycle de développement de trois espèces de *Plasmodium* chez *Anopheles* (*P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*).

Durant toutes ces périodes, seule l'écorce de « l'arbre à fièvre » était utilisée dans le traitement du paludisme. Elle a été introduite, expérimentée et exportée par les missionnaires jésuites en 1632<sup>26</sup>.

En 1820, Pierre Joseph Pelletier et Joseph Bien aimé Caventou parvinrent à séparer les alcaloïdes cinchonine et quinine, de la poudre de l'écorce de « l'arbre à fièvre », permettant la standardisation des doses de ces composants actifs<sup>27</sup>.

Quelques années plus tard (1832), le traitement curatif et prophylactique de la quinine fut perfectionné par François Clément Maillot. Pourtant, ce n'est qu'en 1881 que sa contribution fut officiellement reconnue à l'occasion du Congrès sur le paludisme tenu à Alger.

L'utilisation d'insecticides interviendra alors dès la fin de la 2ème guerre mondiale. Et en 1957, l'OMS lançait une vaste campagne d'éradication du paludisme basée sur la lutte au Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et la chimio-prophylaxie de masse. Les vecteurs du paludisme développèrent une résistance aux insecticides et cette campagne fut un échec en Afrique. Depuis 1960, l'avenir s'est assombri par la découverte de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine (antipaludique de synthèse le plus largement utilisé) en Asie du sud-est et en Amérique latine. Simultanément, de nombreuses souches d'anophèles résistantes aux insecticides sont apparues. L'OMS a dû renoncer en 1968 à son programme ambitieux d'éradication du paludisme et s'en est tenue à des projets plus limités de contrôle de la morbidité et de la mortalité<sup>28,29</sup>.

Plusieurs molécules telles que: l'Amodiaquine, la SP et l'artémisinine ont été introduite l'une à la suite de l'autre à partir des années 1970. L'introduction de ces nouvelles molécules a été à chaque fois marquée par l'apparition des parasites résistants. Malgré cette situation, il ressort de nos jours que des efforts louables ont été fait du point de vue du contrôle de la morbidité et de la mortalité avec une quarantaine de pays ayant déclaré une absence de cas de paludisme, quelques-uns ont même obtenu des certificats pour avoir éliminé le paludisme sur leur sol<sup>3</sup> Cependant, il est important de noter que les progrès faits par le passé dans la lutte contre le paludisme stagne depuis 2015. Cette situation risque de se dégrader davantage avec la pandémie de la Covid-19 qui a eu un impact négatif très fort, particulièrement en matière de prévention. Un grand nombre de campagnes de distribution publiques de moustiquaires imprégnées ont notamment été annulées, compte tenu du contexte sanitaire. Les systèmes de santé dans leur ensemble ont été également lésés car les ressources ont été redirigées vers la gestion du Covid-19 mettant à mal tous les efforts faits ces dernières années.

#### 1.1.1.2. Espèces pathogènes

L'agent pathogène du paludisme est un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Plus de 140 espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales ont été répertoriées à ce jour, mais seulement six de ces espèces sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *P. falciparum*, principal responsable de la morbidité et de la mortalité du paludisme, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae* et *P. knowlesi*<sup>3,30</sup>.

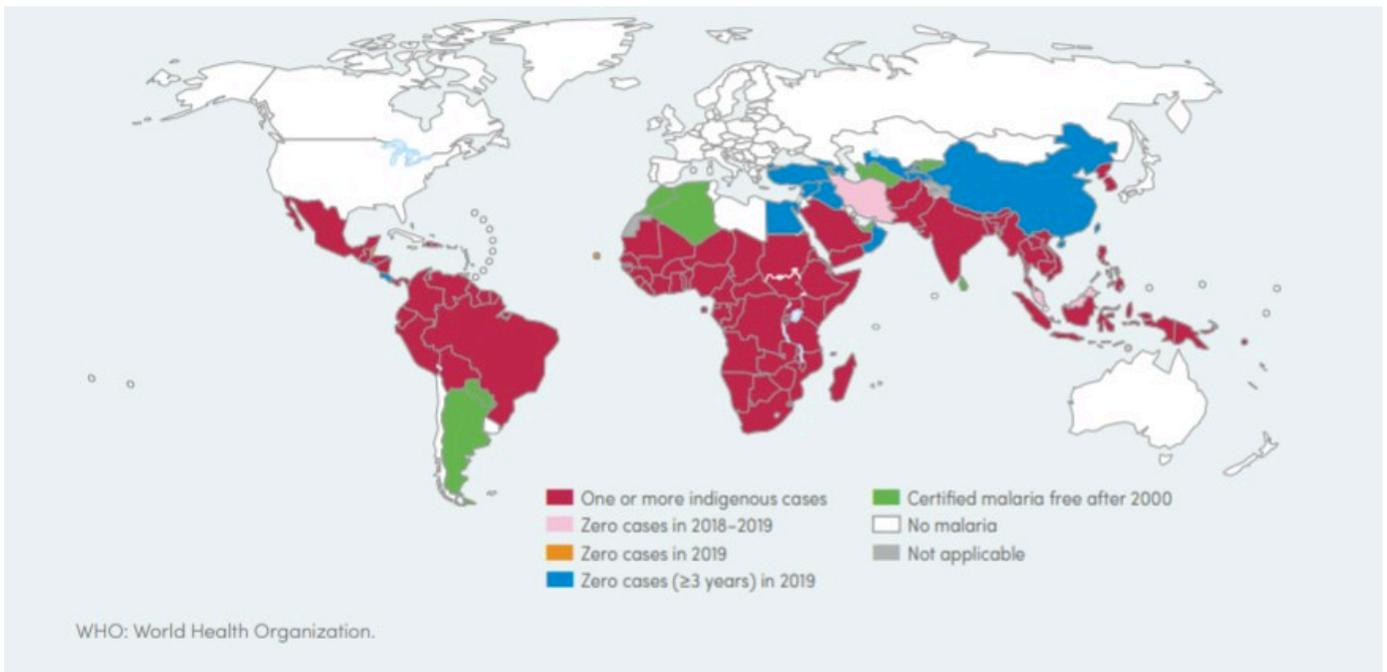
*P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* sont des sous espèces de *P. ovale* morphologiquement similaires avec une distribution sympatrique mais moléculairement distincts.<sup>31</sup>

Contrairement aux autres *Plasmodium*, *P. knowlesi* est un parasite connu pour infecter naturellement les primates non humains, macaques en Asie du Sud-est. Ce parasite est morphologiquement similaire à *P. malariae*, et a été dans un premier temps confondu avec ce dernier lors des diagnostics de paludisme utilisant seulement la microscopie chez l'Homme. Ce n'est que récemment que des études d'épidémiologies moléculaires à large échelle ont permis de dévoiler l'erreur de diagnostic et l'évidence des événements d'échanges parasitaires actuels des macaques vers l'Homme en Asie du Sud-est<sup>32,33</sup>.

### 1.1.1.3. Distribution géographique

La distribution géographique du paludisme est liée à celle des vecteurs et aux conditions climatiques nécessaires au développement du parasite chez l'anophèle. On retrouve le paludisme de façon endémique ou sporadique dans les régions tropicales. La plupart des cas de paludisme (215 millions ou 94%) ont été enregistrés en 2019 sur le continent Africain selon l'OMS, loin devant la région Sud-Est de l'Asie (3%) et la région Méditerranée orientale (2,4%).

Au total, une vingtaine de pays dont dix-neuf de l'Afrique subsaharienne et l'Inde ont concentré quasiment 85 % du nombre total de cas de paludisme dans le monde. Six pays, à eux seuls, ont enregistré plus de la moitié des cas : le Nigéria (23%), la République démocratique du Congo (11%), la République-Unie de Tanzanie (5%), ainsi que le Burkina Faso, le Mozambique et le Niger (4 % chacun)<sup>3</sup>.



**Figure 1** : Carte des pays avec des cas de paludisme en 2000 et leur situation en 2019<sup>3</sup>

### 1.1.2. Cycle de vie de *P. falciparum*

Le paludisme est une protozoose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique vecteur appartenant au genre *Anopheles*. Les moustiques sont les vecteurs exclusifs du paludisme. Sur 3500 espèces de moustiques actuellement recensées dans le monde, seule une soixantaine d'espèces, appartenant toutes au genre *Anopheles*, sont capables de transmettre la maladie. Parmi celles-ci, moins d'une dizaine seulement sont responsables de plus de 99% de la transmission du paludisme au niveau mondial. En Afrique, les espèces *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* sont les vecteurs majeurs. Seules les femelles transmettent la maladie.

Le cycle évolutif de *Plasmodium* (Figure 2) est pratiquement identique pour toutes les espèces infectant l'homme car seules les durées changent. Il est assez complexe et implique deux hôtes : l'Homme (hôte intermédiaire) chez qui se déroule la phase asexuée et l'anophèle (hôte définitif) chez qui se déroule la phase sexuée.

#### ➤ Chez l'homme

Avant un repas de sang, l'anophèle femelle injecte à l'homme de la salive qui empêche la coagulation du sang. Ce faisant, le moustique peut également, s'il est infecté, injecter des sporozoïtes. D'abord présents dans le derme, ces sporozoïtes rejoignent le foie<sup>34</sup> et pénètrent à l'intérieur des hépatocytes au cours des trente minutes suivant l'infestation. S'ensuit alors une phase intra-hépatique qui représente le cycle exo-érythrocytaire schizogonique.

#### - Cycle exo-érythrocytaire schizogonique

Une fois les hépatocytes infectés, les sporozoïtes se multiplient par divisions cellulaires pendant 10-15 jours et forment des schizontes (30-40uM). A maturité, les schizontes lysent et libèrent des mérozoïtes. Pour les espèces telles que *P. vivax* et *P. ovale*, l'infection hépatique peut devenir latente et permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme, alors qu'il aura disparu du sang. Cette étape du cycle du parasite est cliniquement silencieuse. L'éclatement des schizontes libère de nombreux mérozoïtes haploïdes qui passent dans la circulation sanguine pour entamer la phase intra-érythrocytaire du cycle parasitaire<sup>35</sup>.

## - Cycle érythrocytaire schizogonique

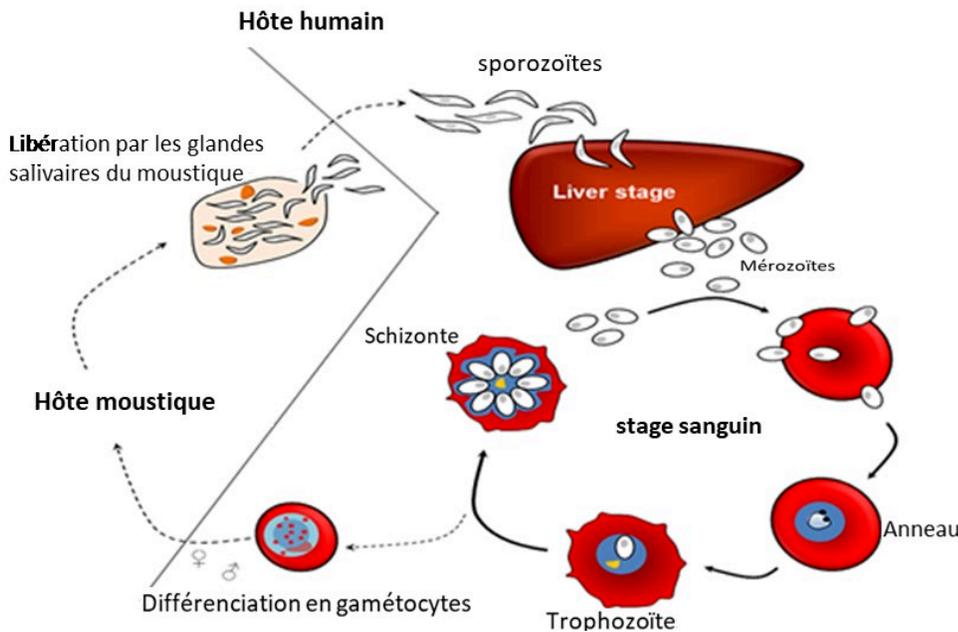
Très rapidement, les mérozoïtes libérés passent dans la circulation sanguine et pénètrent dans les globules rouges. La pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte ou globule rouge et sa maturation en schizonte mature prend 48h pour *P. falciparum*. Cette maturation du mérozoïte en schizonte conduit à la destruction du globule rouge hôte et à la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes pénètrent dans de nouveaux érythrocytes et un nouveau cycle de réplication débute<sup>36</sup>. Cette étape du cycle correspond à la phase symptomatique de la maladie au cours de laquelle la parasitémie s'élève et le sujet devient fébrile. On parle de l'accès palustre.

Dans l'accès de primo-invasion, le développement des parasites est asynchrone, tous les schizontes hépatiques n'arrivent pas à maturité au même moment et la fièvre est souvent continue, anarchique ou irrégulière. Après plusieurs jours d'évolution et en l'absence de traitement, on observe une synchronisation des parasites : tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment, entraînant la destruction d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique, toutes les 48 heures avec pour conséquences une fièvre et par la suite de l'anémie. Certains trophozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours dans le compartiment médullaire, sans division nucléaire, accompagnée d'une différenciation sexuée : ils se transforment en gamétocytes à potentiel mâle ou femelle<sup>36</sup>. A maturité, les gamétocytes restent dans le sang périphérique de l'hôte intermédiaire. Ils seront ensuite ingérés par un anophèle femelle lors d'un repas sanguin, et continueront leur développement en entamant un nouveau cycle.

### ➤ Chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, se différencient en gamètes mâles et femelles. Ils fusionnent en un œuf libre, mobile, dénommé ookinète (seule stade diploïde du parasite). Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif de l'anophèle, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac d'où il subira une méiose et se transformera en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisant des centaines de sporozoïtes qui migreront ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes du parasite, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré, et à entamer un nouveau cycle. La durée du développement sporogonique de *P. falciparum*

varie en fonction des conditions climatiques et est comprise entre 9 et 20 jours à respectivement, 30 °C et 20 °C.



**Figure 2** Adaptée de Jensen, A. R. et al, 2020 : Cycle de vie de Plasmodium chez l'homme et le moustique<sup>37</sup>

Le cycle de vie de *Plasmodium* débute lorsqu'un moustique *Anopheles spp.* femelle infecté, injecte des sporozoïtes au cours d'un repas sanguin. Les sporozoïtes passent de la circulation périphérique de l'hôte au foie, où ils infectent les hépatocytes. Le stade hépatique est asymptomatique et dure environ une semaine. Finalement, les cellules hépatiques infectées se rompent pour libérer les mérozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte. Les mérozoïtes envahissent les érythrocytes, initiant ainsi la phase sanguine asexuée de l'infection, qui provoque tous les symptômes cliniques du paludisme. Une fois à l'intérieur de l'érythrocyte, le mérozoïte subit une série de divisions (schizogonie) sur une période de 48 heures, après quoi des mérozoïtes filles sont libérés pour infecter de nouveaux érythrocytes. Certains parasites asexués ne subissent pas de schizogonie, mais se développent en précurseurs sexuels (gamétocytes), qui peuvent être absorbés par les moustiques lors d'un repas sanguin pour compléter le cycle de vie.

### 1.1.3. Physiopathologie du paludisme à *P. falciparum*

La physiopathologie étudie les mécanismes des états d'altération de la santé, et plus spécifiquement les changements fonctionnels qui accompagnent les atteintes organiques, les syndromes et la maladie. A ce titre, la physiopathologie du paludisme est encore imparfaitement connue, bien que les répercussions de l'infection palustre sur certains organes aient été bien décrites. Cela s'explique par le caractère

complexe et plurifactoriel de la maladie, dont les principaux mécanismes impliquent l'hôte et le parasite. Le paludisme se manifeste par des accès de fièvre encore appelés « accès palustre ». Il est habituel de décrire l'accès de primo-invasion survenant pour la première fois chez un patient « naïf » (n'ayant plus d'immunité contre le paludisme, ou n'ayant pas rencontré le parasite auparavant), et les accès palustres récurrents survenant chez les sujets déjà infectés par *Plasmodium*.

En pratique, on distingue les accès palustres simples et les accès palustres graves. Les accès palustres simples à *P. falciparum* sont susceptibles de se transformer en forme grave quand ils sont non diagnostiqués ou non traités.

### ➤ Accès palustre simple ou non compliqué

Le diagnostic du paludisme n'est pas évident car ses symptômes (fièvre, maux de tête et frissons) peuvent être facilement confondus avec des infections telles que la grippe. Le paludisme non compliqué se définit comme étant sans éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux. De fait, sur le plan clinique, la suspicion de paludisme repose principalement sur la présence d'un état fébrile ou d'antécédents de fièvre.

La libération de l'hémozoïne (pigment malarique) au moment de l'éclatement des hématies parasitées, serait responsable de la fièvre observée pendant la maladie. Lors des premiers cycles érythrocytaires, les parasites étant encore mal synchronisés, la fièvre a alors une allure continue, plus ou moins modérée selon la parasitémie. Une fois les parasites synchronisés, la libération du pigment malarique est régulièrement répétée, ce qui confère à l'accès palustre l'une de ses principales caractéristiques cliniques : la fièvre par périodicité.

### ➤ Accès palustre grave et le neuropaludisme

#### - Accès palustre grave

Un paludisme grave se définit par l'association de trophozoites de *P. falciparum* dans le sang et d'au moins un des critères de gravité de l'OMS. Ces critères sont détaillés dans le tableau 1 ci-dessous ; en notant que ces manifestations peuvent être isolées soit associées chez le même patient. Le paludisme grave est dû très majoritairement à *P. falciparum* et survient généralement 6 à 14 jours après l'infection. Il peut apparaître d'emblée, ou après un traitement inadapté ou tardif.

**Tableau 1** : Critères de gravité du paludisme OMS, 2000. Mise à jour 2017 des RPC 2007, SPILF

<b>Critères</b>	<b>Particularités</b>
Neuropaludisme	Score de Glasgow < 9 ou score de Blantyre < 2 chez l'enfant de moins de 5 ans
Troubles de la conscience	Score de Glasgow entre 9 et 15 chez l'enfant de plus de 5 ans ou score de Blantyre entre 2 et 4 chez l'enfant de moins de 5 ans Obnubilation, confusion, somnolence
Syndrome de détresse respiratoire	Définition clinique
Prostration	Faiblesse généralisée, patient incapable de s'asseoir ou de se tenir debout ou de marcher sans assistance
Convulsions répétées	Au moins 2/24h
Collapsus circulatoire	TAS < 50 mmHg chez l'enfant de moins de 5 ans, avec signes Périphériques
Hémorragie	Définition purement clinique
Ictère	Clinique ou bilirubine totale > 50 $\mu$ mol/L
Œdème pulmonaire	Définition radiologique
Acidose métabolique	Bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L
Hémoglobinurie macroscopique	Urines rouges foncées ou noires
Anémie profonde	Hémoglobine < 5 g/dl, hématocrite < 15% chez l'enfant de moins de 5 Ans
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/L

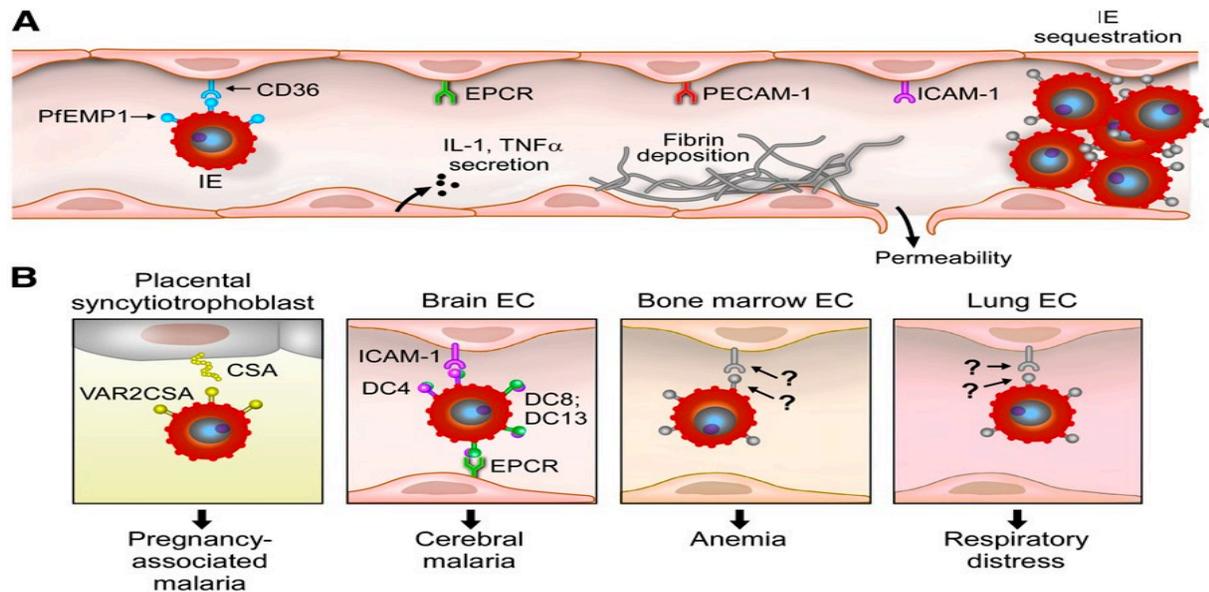
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques > 5 mmol/L
Hyperparasitémie	> 4% chez le sujet non immun > 20% chez le sujet immun
Insuffisance rénale	Créatinémie > 265 umol/L ou diurèse < 12 ml/kg/24h malgré Réhydratation

#### - Le neuropaludisme

Le neuropaludisme est la complication la plus grave et la plus mortelle des paludismes à *P. falciparum*.

Même si ce type de paludisme est beaucoup plus fréquent chez les enfants vivant en Afrique subsaharienne, il convient de l'évoquer chez les individus non immuns (voyageurs n'ayant jamais été en contact avec le parasite), ayant une déficience de conscience et qui ont récemment voyagé dans une zone d'endémie palustre. Bien que l'anémie joue un rôle important dans la gravité du paludisme, il est de plus en plus évident que les formes graves du paludisme et le dysfonctionnement des organes qui en résulte sont provoquées par la séquestration des érythrocytes infectés (EI) dans les cellules endothéliales. Ces formes graves sont observées avec l'espèce *P. falciparum*, du fait de sa capacité à adhérer aux parois de l'endothélium vasculaire.

L'adhésion des EI à la surface des cellules endothéliales vasculaires de l'hôte (cytoadhésion) entraîne leur séquestration dans les capillaires et les veinules réduisant le diamètre de la lumière vasculaire ; provoquant ainsi un blocage de la micro circulation et une carence en oxygène tissulaire. À l'obstruction du flux sanguin par les EI séquestrés s'ajoute l'agglutination de ces derniers entre eux (phénomène de clumping/autoagglutination) et aux globules rouges non parasités (phénomène de rosetting)<sup>38</sup>. Ces différents phénomènes sont responsables du paludisme cérébral et gestationnel. La liaison des EI aux parois endothéliales est médiée par un groupe d'antigènes, appelés antigènes variants de surface (AVS) et qui sont exprimés à la surface des globules rouges. La mieux décrite des protéines impliquées est la protéine membranaire 1 des érythrocytes *P. falciparum* (PfEMP1), codée par une famille d'environ 60 gènes variants associés à différents phénotypes de liaison. PfEMP1 est capable de se lier à de nombreux récepteurs situés sur les cellules endothéliales de l'hôte, et induire selon l'organe concerné un paludisme associé<sup>39</sup> (Figure3).



**Figure 3** : Interactions caractéristiques de la séquestration des érythrocytes infectés par *P. falciparum* dans les micro-vaisseaux<sup>39</sup>

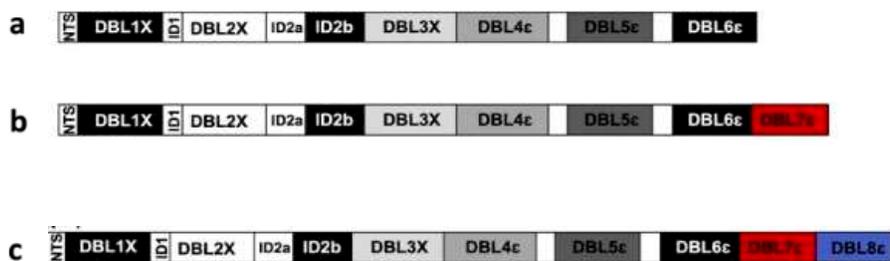
La séquestration des EI aux tissus endothéliaux résulte des interactions adhésives entre les Antigènes Variants de Surface (AVS), exprimés à la surface des EI et des récepteurs moléculaires présents sur les cellules endothéliales, placentaires, mais aussi au niveau des érythrocytes non-infectés (Rosetting : la formation des rosettes par adhésion des globules rouges parasités aux globules rouges sains). (A) Les récepteurs des AVS sont impliqués dans des syndromes cliniques particuliers du paludisme. Du fait que plusieurs organes sont des cibles de cette séquestration, plusieurs phénotypes cliniques peuvent être observés chez le malade, chacun résultant de l'organe affecté. (B) présente les syndromes cliniques graves du paludisme associé à quelques organes et les types d'interactions qui caractérisent cette séquestration<sup>39</sup>.

### 1.1.3.1. La protéine VAR2CSA

VAR2CSA est l'une des protéines les plus étudiées et la plus caractérisée de la famille des *PfEMP-1* à cause de sa séquence relativement conservée et surtout parce qu'elle a été identifiée comme responsable de l'adhérence des parasites au placenta au cours du paludisme gestationnel. Aussi, plusieurs données présentent VAR2CSA comme le principal candidat vaccin pour prévenir le paludisme gestationnel, car il a été démontré que les parasites isolés du placenta expriment uniformément cette protéine<sup>40-43</sup>.

VAR2CSA est une protéine transmembranaire de 350 kDa. Sa partie extracellulaire a été décrite jusqu'alors comme composée de six domaines DBL entrecoupés par des inter-domaines de taille variable, d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un segment intracellulaire assez conservé (Acidic Terminal Segment – ATS)<sup>44,45</sup>. Cependant, les travaux de Doritchamou et ses collaborateurs ont démontré l'existence de deux autres DBL7 et DBL8, indiquant ainsi que la structure de VAR2CSA reste encore mal connue<sup>46</sup>.

Bien que relativement conservée, VAR2CSA comporte également des régions fortement polymorphes et semi-conservées dans les domaines DBL<sup>47</sup>. Ces régions polymorphes sont exposées en surface et sous la pression immunitaire.



**Figure 4 :** Adaptée de Doritchamou, J. Y. A. et al, 2019 : Différentes structures architecturales de VAR2CSA<sup>46</sup>.

(a) représente la structure typique de VAR2CSA avec les domaines NTS-DBL1X-6. (b-c) montrent des structures atypiques de VAR2CSA. (b) NTS-DBL1X-7 ; et (c) NTS-DBL1X-8.

#### 1.1.4. Stratégie de lutte contre le paludisme

Un monde sans paludisme est une question de volonté et de moyens. Cela suppose aussi de garantir l'accès universel à la prévention, au diagnostic et au traitement du paludisme, tout en accélérant les efforts vers l'élimination et vers l'obtention du statut exempt de paludisme et enfin de faire de la surveillance du paludisme une intervention de base. Pour y parvenir, une stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 qui vise à réduire les taux de mortalité palustre et l'incidence de la maladie d'au moins 90% d'ici 2030 a été adoptée durant l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2015<sup>2</sup>. Elle repose principalement sur trois axes :

- la lutte anti vectorielle,
- le diagnostic rapide associé à un traitement efficace des formes cliniques,
- le traitement préventif intermittent des populations à risque.

### **1.1.4.1. Paludisme et Prévention**

#### **1.1.4.1.1. Lutte antivectorielle**

On estime aujourd'hui que la lutte antivectorielle est le principal moyen de prévention et de réduction de la transmission du paludisme. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations sont les deux formes de lutte antivectorielle efficaces connues<sup>48</sup>. Les résultats issus de la mise en place de ces moyens de lutte s'en trouveraient grandement améliorés si l'on y rajoutait l'assainissement des points d'eaux stagnantes qui constituent l'un des facteurs aggravant la situation.

##### **1.1.4.1.1.1. Moustiquaires imprégnées d'insecticides**

Les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) représentent un moyen de lutte efficace contre le paludisme. Ils permettent la réduction des contacts entre le moustique vecteur et l'Homme grâce à l'obstacle matériel qu'elles constituent et à l'effet répulsif des insecticides utilisés<sup>49,50</sup>. En 2018, presque la moitié de la population exposée au risque de paludisme en Afrique était protégée par des moustiquaires imprégnées, contre 29% en 2010. La couverture des MII n'a toutefois pas vraiment augmenté depuis 2016<sup>50</sup>.

##### **1.1.4.1.1.2. Pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations**

Elle consiste à pulvériser des insecticides de la classe des pyréthrinoïdes à l'intérieur des habitations, une ou deux fois par an en général. Ce moyen de lutte a un plus grand impact dans le cas de certaines espèces de moustiques telles *Anopheles funestus* résidant dans les habitations. Pour que ce moyen de lutte montre une grande efficacité, il faut un niveau de couverture élevé de pulvérisation ; ce qui signifie avoir une protection communautaire significative. Cette protection communautaire significative a été observée en Afrique Subsaharienne. Cependant, cette avancée est menacée par l'émergence de la résistance des *Anopheles* aux insecticides. En effet, au niveau mondial, la protection par pulvérisation des insecticides à effet rémanent, qui avait atteint un pic de 5% en 2010, ne dépassait pas 2% en 2018<sup>18</sup>. Ce recul a été observé par l'OMS dans toutes les régions, exception faite de celle de

la Méditerranée orientale. Selon le dernier rapport de l’OMS sur le paludisme dans le monde, 73 pays ont signalé une résistance à au moins une des quatre classes d’insecticides généralement utilisées entre 2010 et 2018, et 27 pays ont notifié une résistance à toutes les classes d’insecticides principales. Cette baisse de couverture serait intervenue au fur et à mesure que les pays étaient en train de remplacer les pyréthrinoïdes par des insecticides plus coûteux afin de lutter contre la résistance des vecteurs à cette classe d’insecticide<sup>3</sup>.

#### **1.1.4.1.2 Le TPI**

L’OMS recommande en plus des autres mesures, le TPI avec la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) pour les femmes enceintes vivant dans des zones où la transmission est modérée à forte, à chaque visite prénatale programmée après le premier trimestre de grossesse. De même, pour les nourrissons vivant en Afrique dans des zones de forte transmission, trois doses de SP en traitement préventif intermittent sont recommandées en même temps que les vaccinations systématiques<sup>14</sup>. De plus, depuis 2012, l’OMS recommande la chimioprévention saisonnière du paludisme (CPS) comme stratégie complémentaire dans la lutte contre le paludisme pour la sous-région du Sahel. Cette stratégie consiste en l’administration d’un traitement mensuel d’amodiaquine et de SP à tous les enfants de moins de cinq ans pendant les saisons de forte transmission ; réduisant de près de 80 % l’incidence du paludisme grave et non compliqué<sup>51</sup>.

### **1.1.4.2. Paludisme: Diagnostic et prise en charge**

#### **1.1.4.2.1. Diagnostic**

Le paludisme est l’une des maladies les plus connues dans le monde. Malgré ce fait, son diagnostic clinique n’est pas évident du fait de l’ambiguïté existante entre ces symptômes et ceux observés dans le cas d’infections virales et bactériennes. Pourtant, il s’avère très important qu’un diagnostic clair soit établi afin qu’un traitement approprié soit administré pour guérir la maladie. Plusieurs méthodes sont utilisées dans le diagnostic du paludisme. Parmi elles, on peut citer les tests de diagnostic rapide (TDR), la détection par microscopie et les méthodes de diagnostic moléculaire qui sont les plus connues et les plus utilisées. Des trois méthodes citées précédemment, la microscopie est la plus utilisée parce qu’elle nécessite un faible investissement, est facile à mettre en place et est capable d’identifier la densité et l’espèce parasitaire. Malgré ces avantages, cette méthode demeure laborieuse, et n’est pas adaptée au haut débit. De plus, elle voit son efficacité diminuée en présence de faibles densités parasitaires<sup>52</sup>.

Une autre technique basée sur la réaction antigène-anticorps a été mise au point afin de pallier aux limites de la détection par microscopie pour le diagnostic du paludisme. Cette méthode est connue sous le nom de tests de diagnostic rapide (TDRs). Elle s'appuie sur des tests immunochromatographiques pour détecter l'antigène du paludisme dans le sang du patient qui s'écoule le long d'une bandelette de nitrocellulose contenant des anticorps antipaludiques spécifiques marqués. La plupart des TDRs visent à détecter trois protéines parasitaires : la protéine riche en histidine II (HRP-II), la lactate déshydrogénase (pLDH) et l'aldolase. La protéine HRP-II est présente dans le cytoplasme et la membrane de l'érythrocyte infecté par *P. falciparum*. La protéine pLDH et l'aldolase sont des enzymes glycolytiques du genre *Plasmodium* qui sont utilisées pour détecter les stades parasitaires asexués et sexuels. Ces méthodes restent peu sensibles dans la détection des espèces autres que *P. falciparum*<sup>52</sup>. Les TDRs ont des limites (Observation de faux négatifs liés à la délétion du gène *pfhrp2/3* chez *P. falciparum*) et une spécificité accrue pour *P. falciparum*. C'est pour cette raison que les méthodes d'amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été développées<sup>53</sup>.

Cette dernière méthode permet d'identifier les différentes espèces parasitaires et de les quantifier même quand elles sont à de très faibles densités parasitaires. Elle nécessite cependant du personnel formé et de grands investissements auxquels n'ont pas toujours accès certaines zones rurales où la transmission du paludisme est modérée à élevée<sup>52</sup>.

#### **1.1.4.2.2. Prise en charge et traitement**

Le traitement des accès palustres à *P. falciparum* s'effectue par voie orale pour le paludisme simple et par voie intraveineuse (IV) jusqu'à ce que la voie orale soit possible de nouveau pour le paludisme grave. Le choix des médicaments dans le traitement du paludisme est généralement fonction de chaque zone, du rapport bénéfice/risque, de la disponibilité et des effets indésirables de ces derniers.

Quatre familles de molécules ont été ou continuent toujours d'être utilisées dans le traitement du paludisme simple et grave. Parmi ces familles, nous avons la famille des quinoléines (Amino-4 quinoléines et Amino-alcools), les dérivés d'artémisinine, des antimétabolites (Antifoliques et Antifoliniques) et enfin celle des Naphtoquinones.

#### 1.1.4.2.2.1. Molécules antipaludiques de la famille des quinoléines

Cette famille est composée des Amino-4 quinoléines (Chloroquine et Amodiaquine) et des Amino-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine et luméfantrine). Les molécules de la famille des quinoléines sont des schizonticides à action rapide en plus d'avoir une activité gamétocytocide sur *P. vivax* et *P. malariae* en ce qui concerne la chloroquine<sup>54</sup>. Bien qu'ayant été utilisées pendant longtemps en première ligne, ces molécules sont aujourd'hui utilisées en seconde intention dans le traitement du paludisme à *P. falciparum*<sup>55</sup>.

Le premier médicament antipaludique à avoir été utilisé contre le paludisme fut la quinine (QN). Elle fut découverte dans les années 1800 et entièrement synthétisée en 1944<sup>56</sup>. Elle est utilisée dans le traitement du paludisme à *P. falciparum*<sup>57</sup> et dans le traitement des cas graves de paludisme. Au cours d'une infection à *P. falciparum*, le parasite digère l'hémoglobine et libère l'hème libre, qui est toxique pour la cellule. Le parasite convertit l'hème libre en une forme cristalline appelée hémozoïne. Durant le traitement, la QN inhibe la formation de l'hémozoïne, tuant ainsi les parasites<sup>54</sup>. Tout comme la QN, la chloroquine (CQ) et la méfloquine (MQ) ont pour cible l'hémozoïne.

#### 1.1.4.2.2.2. Les antimétabolites

Les antimétabolites agissent sur la synthèse des acides nucléiques des plasmodies. Ce groupe est composé d'antifolates incluant des antifoliques (sulfamides et sulfones), des antifoliniques (pyriméthamine et proguanil) et des antibiotiques (doxycycline). Contrairement aux molécules de la famille des quinoléines, les antimétabolites sont des schizonticides à action lente. De plus, la pyriméthamine a également une activité schizonticide tissulaire et hypnozoïticide<sup>55</sup>.

Les antifoliques inhibent la dihydroptérorate synthase (DHPS) qui est une enzyme intervenant dans la synthèse de l'acide folique. Les antifoliniques quant à eux sont des inhibiteurs de la dihydrofolate reductase (DHFR) qui est une enzyme réduisant la dihydrofolate en tétrahydrofolate sachant que les dérivés du folate sont essentiels à la réplication de l'ADN et la division cellulaire. L'association sulfadoxine et pyriméthamine (SP) est aujourd'hui utilisée en deuxième ligne en Afrique dans les zones où il existe une résistance aux autres médicaments efficaces mais aussi et surtout dans le traitement préventif intermittent de la femme enceinte et des nouveaux nés<sup>58</sup>.

#### 1.1.4.2.2.3. Molécules antipaludiques de la famille des Naphtoquinones.

La famille des naphthoquinones est composée principalement de l'atovaquone qui est un analogue de l'ubiquinone et qui inhibe spécifiquement la chaîne de transport d'électron au niveau du cytochrome bc1 de la mitochondrie lorsqu'il est administré à faible dose. Administré à forte concentration, l'atovaquone se comporte comme un antagoniste compétitif ubiquitaire de l'ubiquinone en se fixant sur son site d'oxydation au niveau du cytochrome b codé par le gène mitochondrial *pfcytb*<sup>59</sup>. Cette fixation entraîne une inhibition du transport des électrons ainsi qu'une dépolarisation de la membrane mitochondriale<sup>60</sup>. L'atovaquone est utilisée en combinaison avec le proguanil dans le traitement du paludisme. L'administration simultanée d'atovaquone et de proguanil entraîne une synergie d'action sur le potentiel de membrane mitochondrial<sup>61</sup>. Le proguanil a été décrit comme une classe d'inhibiteurs indirects du complexe I de la chaîne respiratoire<sup>62</sup> et semble jouer le rôle d'*enhancer* de l'atovaquone.

#### 1.1.4.2.2.4. Les dérivés d'artémisinine

L'artémisinine est une ancienne plante médicinale chinoise, reconnue pour son action antipaludique rapide et qui a été introduite en 1977<sup>54</sup> dès lors que les parasites commençaient à résister aux molécules citées précédemment. Cependant, sa réelle utilisation n'a été autorisée qu'à partir des années 2000 par l'OMS.

En raison de leur faible biodisponibilité et de leur demi-vie de quelques heures, les dérivés : d'artémisinine (principalement l'artésunate (soluble dans l'eau), l'artéméter (soluble dans les lipides) et la dihydroartémisinine (DHA) sont utilisés en association avec d'autres médicaments antipaludiques à durée d'action plus longue appelés CTAs (Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine), tel que recommandé par l'OMS en 2001 comme thérapie de première ligne pour le traitement du paludisme simple, paludisme cérébral et du paludisme résistant aux autres molécules antipaludiques. Les CTAs ont une activité de schizonticides sanguins et ciblent tous les stades intra-érythrocytaires du parasite. Elles empêchent également le développement des gamétocytes par leur action sur le stade ring du parasite et sur le stade précoce des gamétocytes (I-III)<sup>17</sup>.

L'action biologique de ce médicament sur le parasite n'est pas très bien connue. L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique (anciennement appelés principes amères ou amères aromatiques) de formule brute C<sub>15</sub>H<sub>20</sub> portant un groupe peroxyde qui semble être la clé de son efficacité. L'artémisinine et ses dérivés exercent leur activité antiparasitaire grâce à leur structure endoperoxyde, preuve en est

l'absence de propriétés antipaludiques de la deoxyartémisinine dépourvue de groupement endoperoxyde<sup>63</sup>. L'idée largement admise est que la rupture du pont endoperoxyde, sans doute facilitée par la présence d'hème, produirait des radicaux libres capables de créer un choc oxydatif majeur entraînant la mort du parasite.

### **1.1.4.3. Menaces biologiques liées à la prise en charge du paludisme**

#### **1.1.4.3.1. Délétion des gènes *pfhrp2/3* du parasite**

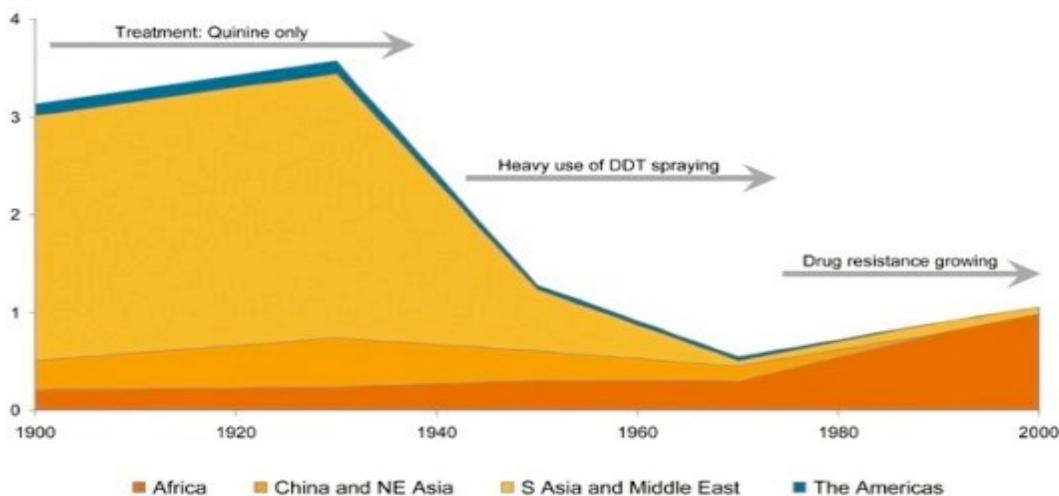
Une des méthodes de diagnostic du paludisme est en péril du fait de l'observation de l'échec de quelques diagnostics. Cette situation soulève des inquiétudes au sein de la communauté scientifique. Rappelons que le fonctionnement des TDRs est basé sur la détection de certaines protéines dont la protéine riche en histidine 2 (HRP2) spécifique à *P. falciparum*. L'échec du diagnostic du paludisme avec l'utilisation des TDRs est dû à la délétion des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* (*pfhrp2/3*) chez *P. falciparum* qui le rendent indétectable par les TDRs.

Sur la base d'études réalisées entre 2019 et 2020, des publications émanant d'une quinzaine de pays ont rapportés des cas de délétion des gènes *pfhrp2/3*. Les conséquences sur le plan clinique restent toutefois à clarifier.

#### **1.1.4.3.2. Résistance aux antipaludiques**

Les précédentes mesures prises dans la lutte contre le paludisme ont permis une diminution drastique du nombre de décès entre 1900 et 1970 pour commencer à augmenter à partir de cette date (figure 5). Cette augmentation du nombre de décès est due à l'émergence et la propagation de la résistance des parasites face aux différentes molécules utilisées dans le traitement du paludisme. Le premier antipaludique de synthèse utilisé dans le traitement du paludisme a été la CQ et l'émergence de la résistance à cette molécule est probablement issues de quatre foyers indépendants : le premier est identifié dans le Sud-Est asiatique en 1957 (à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge), deux autres foyers en Amérique du Sud (Venezuela et Colombie), et le dernier en Papouasie-Nouvelle Guinée<sup>64</sup>. La propagation de cette résistance s'est faite de l'Asie vers l'Afrique à la fin des années 1970 et a été observé pour la première fois au Kenya et en Tanzanie. Ces poches de résistance ont ensuite progressé lentement de proche en proche, touchant l'Afrique centrale et l'Afrique du Sud entre 1982 et 1985, puis l'Afrique de l'Ouest en 1986 où sa diffusion semble s'être stabilisée<sup>19,65</sup>. Puis la MQ a été introduite dans les années

1980 comme traitement de première ligne dans le cas du paludisme non compliqué en Asie du Sud Est<sup>66</sup>. Cinq années seulement d'utilisation de la MQ ont suffi pour que se développent des parasites résistants à cet antipaludique en Asie du Sud-Est (une surexpression du gène *pfmdr2* a été incriminée). A partir de 2001, elle a été largement utilisée en combinaison avec l'artésunate<sup>67</sup>. Après l'émergence de la résistance à la chloroquine, la pyriméthamine a été introduite en monothérapie. Mais très rapidement, la résistance à la pyriméthamine a émergé. Elle fut donc utilisée en association avec la sulfadoxine qui est un antibiotique de la famille des sulfonamides. Introduite en Thaïlande en 1967<sup>68</sup>, la résistance à cette combinaison sulfadoxine et pyriméthamine (SP) ne tarda pas non plus et se répandit également en Afrique. En dernier recours, l'artémisinine fut introduite pour le traitement du paludisme en combinaison avec une drogue à action lente (SP, Amodiaquine, Lumefantrine, Piperaquine ou Mefloquine). Bien que la SP ait été à son tour remplacée par l'artémisinine, elle reste efficace et recommandée dans le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte et chez l'enfant.



**Figure 5** : Evolution de la mortalité au fil des années

La résistance partielle à l'artémisinine fut pour la première fois rapportée en 2008 à l'ouest du Cambodge<sup>69</sup> grâce à la durée de clairance parasitaire allongée observée chez deux patients traités à base d'artésunate monothérapie. La présence de parasites résistants dans la province de Pailin au Cambodge – démontré en 2009 via un procédé similaire<sup>19</sup> confirma ces résultats initiaux. Depuis, des cas de résistance à l'artémisinine ont été observés au Myanmar, au Vietnam, au Laos, en Chine<sup>70</sup> et en Inde<sup>69,70</sup>. Pendant très longtemps, l'Afrique a été épargnée par l'expansion de la résistance à l'artémisinine.

Cependant, des études menées respectivement en Ouganda et au Rwanda<sup>20,21</sup> ont identifié des mutations associées à la résistance à l'artémisinine tout en démontrant que leur émergence est locale dans cette partie de l'Afrique.

#### **1.1.4.3.3. Caractérisation de la résistance à l'artémisinine et la découverte d'un déterminant moléculaire de la résistance aux dérivés d'artémisinine : le gène *pfk13***

La résistance à l'artémisinine a été détectée pour la première fois, grâce à un retard dans la clairance parasitaire observé chez deux patients souffrant de paludisme et traités à l'artémisinine monothérapie au Cambodge. Cette observation fut peu de temps après confirmée grâce à un procédé similaire. Dès lors, la résistance à l'artémisinine a été définie cliniquement comme une réduction de la vitesse d'élimination des parasites chez le patient traité (mesurée par l'estimation de la demi-vie de clairance parasitaire) que ce soit en monothérapie ou en CTAs. Selon la définition de l'OMS, la résistance clinique à l'artémisinine est avérée lorsque la demi-vie de clairance parasitaire est supérieure à 5,5 heures<sup>18</sup>. Cette définition clinique de la résistance s'avérait toutefois longue et coûteuse avec notamment plusieurs prélèvements de sang dans les 24 premières heures.

##### **1.1.4.3.3.1. La découverte d'un déterminant moléculaire de la résistance aux dérivés d'artémisinine : le gène *pfk13***

Le suivi clinique des patients dans le but de déterminer la résistance à l'artémisinine était une approche très lourde à mettre en place logistiquement. Pour combler cette difficulté, une méthodologie *in vitro* / *ex vivo* a été développée. Ce phénotypage nommé « Ring-stage Survival Assay », qui consistait à évaluer la capacité des formes jeunes du parasites (Ring-stage) à survivre à une pression courte d'une dose unique de DHA a simplifié la détermination de cette résistance<sup>17</sup>. Par définition, un phénotype de résistance est avéré si au moins 1% des parasites survivait au test RSA. Cependant, le développement d'outils de génotypage complet des parasites et la détermination précise du phénotype de résistance ont facilité la détermination de la base moléculaire de cette résistance particulière.

Pour ce faire, des analyses génomiques comparatives ont été effectuées entre une lignée résistante à l'artémisinine (F32-ART5 d'origine tanzanienne); générée *in vitro* par pression de sélection médicamenteuse) et la souche sauvage initiale (F32-TEM). Cette comparaison a permis d'identifier huit

mutations non-synonymes sur sept gènes différents de la souche F32-ART5<sup>71</sup>. Parmi ces mutations figure la mutation M476I retrouvée sur le locus PF3D7\_1343700. Cette dernière est apparue après 30 cycles de pression de sélection médicamenteuse et a été associée à un RSA 0-3h supérieur à 1%, suggérant son implication dans la résistance aux dérivés d'artémisinine. Parallèlement, des génotypages ont été également fait sur 49 isolats parasitaires collectés entre 2010 et 2011 au Cambodge et adaptés en culture. Plusieurs mutations non-synonymes situées sur le locus PF3D7\_1343700 ont été répertoriées et associées à un RSA >1% alors qu'elles étaient absentes des isolats et souches de référence sensibles aux dérivés d'artémisinine (souches 3D7, 89F5 et K1992). Collectivement, ces résultats ont montré l'association des mutations sur ce locus avec la résistance à l'artémisinine. Ce locus a été dénommé par la suite *P. falciparum kelch 13 (pfk13)*<sup>71</sup>. Des expériences complémentaires de transfection sur *pfk13* ont révélé que la seule présence de ces mutations peut conférer la résistance à l'artémisinine<sup>72,73</sup>, permettant de considérer *pfk13* comme un marqueur, mais aussi comme un déterminant moléculaire de la résistance à l'artémisinine.

#### 1.1.4.3.3.2. Description du gène *pfk13*

Le gène *pfk13* code la protéine *pfk13* d'une longueur de 726 acides aminés. Elle appartient à la superfamille de protéines contenant un domaine en forme de propulseur, communément appelé *propeller* (signifiant hélice en anglais) ou *Kelch*<sup>71,74,75</sup>. Cette protéine est composée de trois domaines annotés : un domaine coiled-coil (c'est-à-dire deux hélices  $\alpha$  parallèles qui s'enroulent entre elles ; acides aminés 212 à 341), un domaine BTB (pour Broad-Complex, Tramtrack and Bric-à-brac; acides aminés 350 à 437) et un domaine propeller de type Kelch (acides aminés 443 à 726). Le domaine propeller de *pfk13* est composé de la répétition de six motifs kelch<sup>74,75</sup> et concentre la grande majorité des mutations de résistance à l'artémisinine associées à un taux de survie RSA 0-3h supérieur à 1% et/ou à une clairance parasitaire retardée in vivo. Enfin, des expériences de mutagenèse ont suggéré le rôle essentiel du gène *pfk13* pour la croissance intra-érythrocytaire de *P. falciparum* et *P. berghei* lors de la phase asexuée<sup>76,77</sup>. Au total, près de 200 mutations ont été répertoriées à travers le monde. Cependant, seulement une trentaine de mutations non-synonymes ont été associées à un phénotype de résistance dans diverses populations parasitaires d'Asie du sud-est en 2018<sup>70</sup>. Catégorisées selon leur niveau de caractérisation par des approches cliniques et des expérimentations in vitro, neuf mutations non-synonymes du gène *pfk13* (F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, C580Y) ont été officiellement validées par l'OMS comme conférant la résistance à l'artémisinine.

Par la suite, onze autres mutations (P441L, G449A, C469F, A481V, P527H, N537I, G538V, V568G, P574L, F673I, A675V) ont également été associées à un retard de clairance dans des études cliniques, auxquelles s'ajoutent onze mutations (D452E, C469Y, K479I, R515K, S522C, N537D, R575K, M579I, D584V, P667T, H719N) retrouvées à faible fréquence dans les populations naturelles. Les 22 dernières mutations non-synonymes listées ci-dessus sont considérées comme mutations de résistance « candidates » par l'OMS.

La découverte de *pfk13* comme marqueur de résistance a permis très tôt de détecter les formes résistantes du paludisme et cartographier leur distribution. Ainsi, on a pu suivre l'évolution de la résistance à l'artémisinine en Asie et son émergence locale en Afrique, en particulier au Rwanda<sup>20</sup> et en Ouganda<sup>21</sup>.

#### **1.1.4.4. Vaccins antipaludiques**

Les vaccins ont été les inventions les plus rentables en matière de santé mondiale car ils ont prouvé leur impact contre des maladies telles que la variole, la polio etc. Aussi, une alternative dans la lutte contre le paludisme serait de disposer d'un vaccin contre le paludisme. Pourtant, son développement contre *P. falciparum* rencontre plusieurs difficultés. Les chercheurs rencontrent des difficultés dans la sélection des cibles parasitaires les plus pertinentes. Le nombre élevé de gènes que comporte chaque espèce de *Plasmodium* implique une diversité de protéines bien supérieure à celle d'un virus compliquant ainsi les recherches. Certaines protéines semblent malgré tout particulièrement intéressantes mais elles existent souvent dans de nombreuses formes, du fait de la coévolution de l'Homme et du parasite depuis des milliers d'années. Il n'existe donc pas de cible unique et stable contre laquelle développer un vaccin. Quelques vaccins prometteurs ont pourtant été développés ; il s'agit du RTS,S et des vaccins contre le paludisme de la femme enceinte PAMVAC et PRIMVAC.

Actif contre *P. falciparum*, le RTS,S/AS01 (RTS,S) est le premier vaccin, et jusqu'ici le seul, ayant démontré une diminution significative de 39% des cas de paludisme simple et 29% de cas de paludisme grave menaçant le pronostic vital des jeunes enfants africains après 4ans de suivi<sup>78</sup>. Bien que plusieurs problèmes soient encore en suspens concernant l'utilisation du vaccin sur le plan de la santé publique, trois pays pilotes – le Ghana, le Kenya et le Malawi ont commencé son introduction en 2019 dans des zones déterminées où la transmission du paludisme est modérée à élevée<sup>79</sup>.

Alors que plusieurs autres vaccins prometteurs tels que le R21 destinés à prévenir la charge de la maladie à l'échelle mondiale sont en cours, des vaccins spécialisés qui permettraient de prévenir les complications du paludisme pendant la grossesse tel que le PAMVAC sont également en cours d'études.

Enfin, tout récemment, suite au succès de la vaccination anti Covid, la société Pfizer a annoncé qu'elle allait travailler au développement d'un vaccin ARN contre le paludisme.

## **1.2. Le séquençage à haut débit**

### **1.2.1. Histoire du séquençage**

Le séquençage d'ADN consiste en la détermination de la séquence nucléotidique d'une portion ou de la totalité de l'ADN présent dans chaque cellule d'un organisme donné. De très nombreux génomes, dont celui de l'être humain, ont été déjà séquencés, et beaucoup d'autres sont en cours de séquençage. Plusieurs laboratoires (publics et privés), participent (parfois de façon concurrente) à cet énorme effort qui révolutionne aussi bien la biologie fondamentale que les biotechnologies. Et pourtant, l'histoire et les fondements du séquençage de l'ADN sont relativement récents au regard de l'histoire de l'humanité en général et de celle du paludisme en particulier.

Allan Maxam, Walter Gilbert (USA) et Frederick Sanger (Royaume-Uni), furent les pionniers de la conquête de la séquence. Tout en mettant au point deux méthodes très différentes, ils sont parvenus à accéder à la lecture de la séquence. Maxam et Gilbert exploitèrent des stratégies de dégradation chimique sélective alors que Sanger choisit une stratégie de synthèse enzymatique sélective<sup>80</sup>. Ces découvertes valurent à Gilbert et Sanger d'être récompensés en 1980 par le prix Nobel de chimie.

Cependant, l'histoire ne retiendra que Sanger, puisque sa stratégie a bénéficié de l'invention de la PCR (invention de Kary Mullis publiée en 1986, lui aussi nobélisé par le prix de chimie en 1993) et du développement de l'électrophorèse capillaire, permettant de simplifier la partie séparative et analytique.

Le séquençage du génome est en général d'autant plus difficile que le génome étudié est grand et riche en séquences répétées. Ce qui nécessite des technologies beaucoup plus avancées.

Aussi, à partir de 2005, on assiste à l'arrivée de nouvelles méthodes de séquençage à haut débit. Ces méthodes de séquençage font appel aux techniques de clonage et d'amplification moléculaire ; leur spécificité relevant de leur stratégie de lecture.

Une certaine frénésie s'est emparée du monde de la biologie moléculaire en 2007, avec la disponibilité d'un très grand nombre de machines de séquençage que l'on qualifie tour à tour de NGS

(Next Generation Sequencing), HTS (High Throughput Sequencing), ou encore de manière plus appropriée séquençage multi-parallélisé, et qui évoluent vers le plus de profondeur de lecture, et/ou vers le moindre coût, rendant obsolètes les versions précédentes<sup>81,82</sup>.

L'arrivée de cette nouvelle technologie a permis le séquençage de 314 génomes entiers d'eucaryotes dont *P. falciparum* et 6 660 génomes d'eucaryotes partiellement séquencés au 4 mars 2014

## **1.2.2. Séquençage de première, deuxième et troisième génération**

Entre 1977 et aujourd'hui, la technologie du séquençage a connu de très grandes avancées. Et, il semble nécessaire de hiérarchiser ces nouvelles technologies. Cependant, dans la suite de notre manuscrit, nous ne nous attarderons que sur les méthodes que nous avons utilisées durant cette thèse (méthode de Sanger et Illumina).

### **1.2.2.1. Séquençage de première génération**

Le séquençage de première génération prend en compte le séquençage par la méthode de Maxam et Gilbert et celle de Sanger. La première n'a plus guère qu'un intérêt historique, tandis que la méthode de Sanger a été automatisée et a largement contribué au séquençage du génome humain en 2001.

#### **1.2.2.1.1. La méthode de Maxam et Gilbert**

Dans cette méthode, l'ADN marqué par une radioactivité terminale est clivé chimiquement au niveau de la guanine (G), de la guanine + adénine (G+A), de la cytosine (C) et de la cytosine + thymine (C+T), produisant des fragments radioactifs de longueur égale à la position de clivage à partir de l'extrémité marquée. La concentration des produits chimiques utilisés est contrôlée de sorte à introduire approximativement une modification par molécule, lesquelles sont séparées par un gel d'électrophorèse. Les fragments d'ADN marqués produits à partir des quatre réactions sont séparés par électrophorèse sur des gels d'acrylamide à haute résolution. La séquence est déduite à partir des bandes sombres indiquant la position des nucléotides marqués<sup>83</sup>.

Cette méthode a été largement acceptée comme méthode de séquençage, en raison de sa capacité à séquencer directement l'ADN purifié. Sa capacité de séquençage était d'environ 500 paires de base (pb). Cependant, elle avait pour inconvénients la complexité de la méthode, l'utilisation de produits chimiques

dangereux, la génération de fragments courts (que nous appellerons *reads*) et la difficulté à différencier les bandes sur gel.

#### **1.2.2.1.2. La méthode de Sanger**

Frederick Sanger, a mis au point la méthode de séquençage de l'ADN en 1977 en se basant sur des inhibiteurs de l'ADN polymérase au niveau de résidus spécifiques<sup>84</sup>. Cette méthode, encore appelée la méthode des didésoxy, a gagné en popularité entre les années 1980 et 2000, car elle nécessitait moins de produits chimiques et des niveaux de radioactivité plus faibles<sup>85</sup>. Cette méthode de séquençage utilise de l'ADN simple brin, une amorce d'ADN, de l'ADN polymérase 1, des désoxynucléosides triphosphates (dNTPs ; dATPs, dTTPs, dCTPs et dGTPs), et des di-déoxynucléosides triphosphates (ddNTPs ; ddATPs, ddTTPs, ddCTPs et ddGTPs). Dans cette méthode, quatre réactions de séquençage différentes sont mises en place pour détecter les quatre nucléotides A, T, C et G. Pour chaque réaction, on utilise de l'ADN (5' -> 3'), de l'ADN polymérase, des dNTPs et un seul des ddNTPs est ajouté.

L'ADN polymérase incorpore les dNTPs complémentaires au brin d'ADN cible et s'arrête lorsqu'elle rencontre un ddNTP, car aucun groupe hydroxyle libre n'est disponible pour réagir avec l'ADN polymérase. Par conséquent, des fragments avec des tailles différentes et la même amorce à l'extrémité 5' sont produits pour chacune des quatre réactions. Les fragments provenant des quatre réactions sont séparés par électrophorèse sur gel et les bandes sombres sur le gel indiquent la position du nucléotide dans la séquence.

Cette méthode fournit des résultats très précis pour les fragments courts uniquement et peut produire des lectures de séquence de 600 nucléotides en moyenne. Les principaux inconvénients de cette méthode sont la liaison non spécifique des amorces et la faible longueur de lecture.

Pour pallier à cette limite, c'est-à-dire pour effectuer le séquençage de séquences d'ADN plus longues, une extension de cette méthode connue sous le nom de méthode de séquençage shotgun a été développée<sup>86</sup>.

#### **1.2.2.2. Séquençage de deuxième génération**

A partir de 2005, le parc technologique des séquenceurs s'est diversifié avec l'émergence des séquenceurs de seconde génération. L'arrivée des méthodes de séquençage de cette nouvelle génération a révolutionné le monde de la recherche. Trois technologies de séquençage dominent actuellement le

marché et se démarquent les unes des autres par les chimies qui les constituent. Cependant, toutes se décomposent en quatre grandes étapes principales :

1ère étape : la préparation des bibliothèques qui contient une étape d'amplification par PCR ;

2ème étape : les cycles de réactions de séquençage ;

3ème étape : la prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant ; et enfin,

4<sup>ème</sup> étape : Analyse des données.

L'avantage de ces nouvelles générations de machines se trouve dans leur capacité à analyser de grands génomes à haute résolution grâce à la parallélisation des réactions.

Les trois grands leaders du séquençage sont : 454/Roche, Solexa/Illumina, SOLiD. Seule, la plateforme Illumina sera décrite car elle a été celle utilisée pour les travaux de séquençage menés au cours de la présente thèse.

#### **1.2.2.2.1. Solexa/Illumina**

La technologie illumina repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer. Cette amplification se fait sur une surface de verre appelée flow cell (FC), similaire à une lame de microscope et divisée en huit lignes. Des adaptateurs sont insérés à l'extrémité des fragments de la bibliothèque à séquencer. Ceux-ci vont permettre la fixation aléatoire des fragments sur la FC en s'hybridant sur les amorces qui en couvrent la surface. Un nouveau brin est alors synthétisé par une polymérase: il est fixé de façon covalente à la FC. Le brin d'origine est alors éliminé par dénaturation et l'extrémité libre du brin restant s'hybride à une amorce adjacente pour former un pont. La polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin puis les deux copies sont libérées par dénaturation. Le cycle d'amplification en pont recommence pour former à terme un regroupement d'ADN clonal en une zone appelée cluster. Les brins anti-sens sont ensuite clivés : c'est la linéarisation. L'extrémité 3' libre des fragments d'ADN est bloquée et l'amorce de séquençage s'y hybride. Le séquençage s'effectue sur des centaines de millions de clusters simultanément, grâce à une chimie de terminateurs réversibles ; c'est à dire que des nucléotides bloqués marqués par fluorescence sont ajoutés, et quand l'un d'entre eux est incorporé, la fluorescence émise est relevée. Puis le fluorophore et le

bloqueur sont clivés permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. A chaque cycle d'incorporation, une base peut être déterminée<sup>82,87,88</sup>.

Cette chimie a pour avantage de séquencer correctement les homopolymères. Elle a cependant pour inconvénient de lire peu de bases (36 à ses débuts, jusqu'à 150 bases aujourd'hui), ce qui la rend toutefois appropriée à l'analyse de génomes dont on a une bonne annotation. L'amplification par PCR est la principale source d'erreurs. Des efforts ont été faits pour améliorer les résultats en modulant les techniques de préparation des bibliothèques<sup>89</sup>.

Pour le séquençage du génome de *P. falciparum*, de meilleurs résultats ont été obtenus avec des conditions de PCR sélectives (polymérase spécifique et enzymes améliorées) dans la préparation des bibliothèques Illumina générant des résultats non biaisés et une plus grande couverture des régions riches en AT<sup>89</sup>. Des efforts continus sont déployés pour éliminer les erreurs et optimiser le processus de séquençage pour faciliter la détection précise des polymorphismes nucléotidiques ou single nucleotide polymorphism (SNP).

### 1.2.2.3. Séquençage de troisième génération

Les techniques de séquençage NGS de 2<sup>ème</sup> génération, bien qu'offrant des débits de lecture largement plus élevés que celles de première génération, ont toutes en commun d'avoir des reads relativement courts (moins de 1 kb). Or le génome comprend beaucoup d'éléments complexes comme les régions fortement répétées et les variations de structure (VS), dont la taille est supérieure à la longueur de ces reads. Les reads d'une région répétée sont difficiles à aligner correctement aussi bien sur le génome de référence que sur la reconstruction de novo si leur taille ne permet pas un empiètement sur une région adjacente aidant à les localiser. La détection de variations de structure (VS) de grande taille est délicate avec des reads courts qui ne chevauchent pas forcément ce réarrangement génétique<sup>90</sup>.

De plus, les régions riches en bases G et C sont difficiles à amplifier par PCR du fait de la formation possible de structures secondaires. Avec le séquençage de 2<sup>ème</sup> génération, une amplification clonale par PCR est nécessaire avant l'étape de séquençage afin d'augmenter le signal détecté ; le séquençage de ces régions n'est donc pas optimum. La phase d'amplification clonale par PCR dans le séquençage de 2<sup>ème</sup> génération est aussi source de biais si une erreur est amplifiée lors de la PCR.

Afin de pallier ces limites, il est rapidement apparu qu'il était nécessaire de développer d'autres méthodes de séquençage de l'ADN ; d'où la mise sur le marché des séquenceurs de 3<sup>ème</sup> génération. Ces

séquenceurs sont capables de générer de très longs reads sans avoir besoin de cloner les fragments pour amplifier le signal<sup>90,91</sup>. C'est pour cette raison qu'on les appelle aussi "Single molecule sequencing".

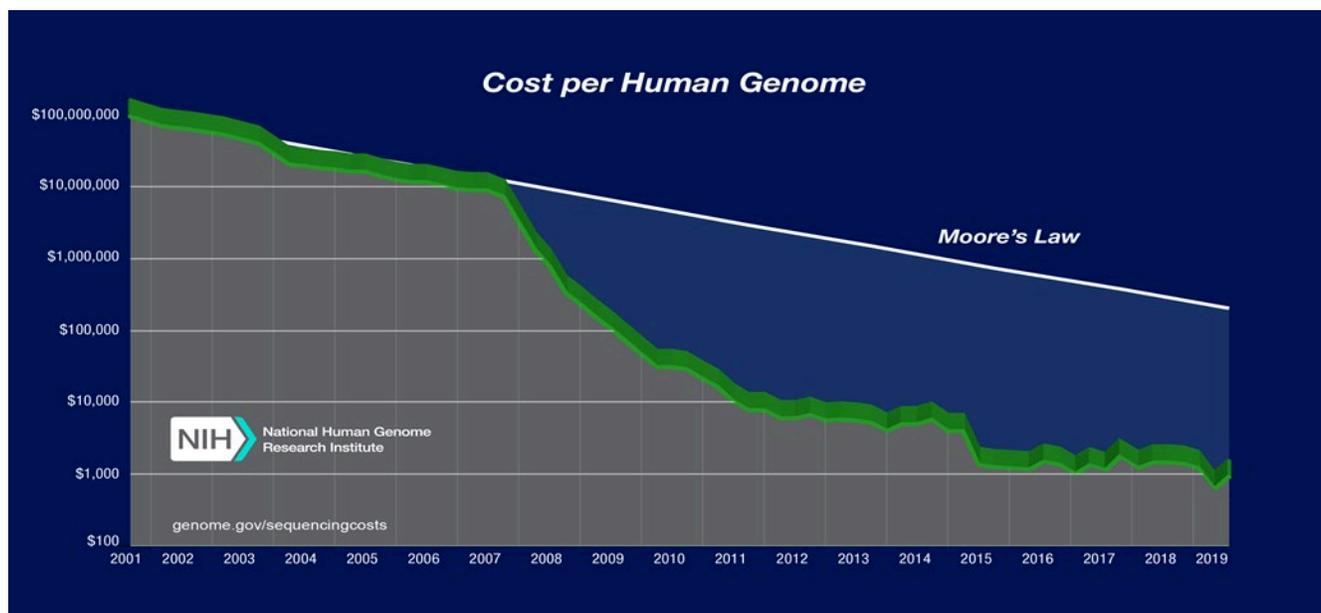
Les deux leaders de cette troisième génération des séquenceurs sont :

- **Pacific Biosciences (PacBio)**, commercialisée en 2011, a pour principe le séquençage de molécules uniques, avec observation en temps réel de l'incorporation de nucléotides fluorescents (Single Molecule Real Time™ (SMRT) sequencing).
- **Oxford Nanopore Technologies (MinION™)**, mis sur le marché en 2014, il a pour principe le séquençage par nanopore. Cette technologie consiste à séquencer sans pré-amplification une molécule d'ADN en hydrolysant les nucléotides élémentaires, qui passeront dans des pores. Ces pores seront couplés à des capteurs saisissant la signature singulière de chaque base constitutive de la molécule à séquencer.

### 1.2.3. Intérêt et coût du séquençage

Depuis 2005, avec l'émergence du NGS, le débit et le coût du séquençage ont évolué de façon phénoménale. On assiste de plus en plus à une augmentation du nombre de génomes séquencés et cette augmentation est corrélée avec une diminution drastique des coûts. L'objectif du « Génome à 1000 dollars » que s'est fixé le monde scientifique semble réalisable au regard de tous les efforts fournis. Des avancées énormes ont été réalisées si l'on tient compte du fait qu'en 2011, plus de 30 000 génomes ont été séquencés<sup>92</sup> pour un coût approximatif de 1 500 dollars le génome, comparé au temps et à l'argent investi en 2003 pour le séquençage du génome humain.

En effet, le premier séquençage complet d'un génome humain s'est achevé en 2003 et a nécessité une dizaine d'années de travail, avec un investissement total estimé à de 2,7 milliards de dollars. Avec l'émergence du NGS, le prix du séquençage partiel d'un génome humain de haute qualité était estimé à 14 millions de dollars en 2006 (Figure 6) et environ 1200 euros de nos jours.



**Figure 6** : Représentation du coût du génome en fonction des années<sup>93</sup> .

*Entre 2001 et 2019, on assiste à une réduction drastique en matière de coût de séquençage du génome humain qui passe de 100.000.000 de dollars à moins de 1000 dollars.*

#### 1.2.4. Séquençage en pratique et Changement d'échelle pour les analyses en laboratoire

Le séquençage « Sanger » est la méthode la plus couramment utilisée jusqu'à présent dans les laboratoires de diagnostic moléculaire et/ou de recherche afin d'établir une séquence d'ADN et ainsi identifier un potentiel variant. Cette méthode peut concerner un seul gène ou un groupe de gènes sélectionnés selon les objectifs fixés.

On parle dans ce cas de stratégie « gène par gène ». Elle consiste en une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des régions exoniques des gènes d'intérêt, indépendamment les uns des autres, à partir de l'ADN génomique. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont séquencés sur un appareil d'électrophorèse capillaire. Une comparaison entre les séquences générées à partir de l'ADN extrait de l'échantillon et la séquence de référence est alors effectuée. Cette comparaison permet de mettre en évidence d'éventuels variants nucléotidiques. La stratégie « gène par gène » est chronophage, coûteuse et le nombre de gènes exploré reste limité.

Cependant, avec le développement des séquenceurs dits de nouvelle génération (NGS), les capacités d'analyses des gènes ont été multipliées. En effet, ces machines sont capables de séquencer

simultanément et indépendamment entre 80 Mégabases (Mb) et 100 Gigabases (Gb) d'ADN, ce qui représente 10 000 à 100 000 fois plus que les capacités des séquenceurs capillaires les plus performants, le génome humain étant de « seulement » 3,2 Gb.

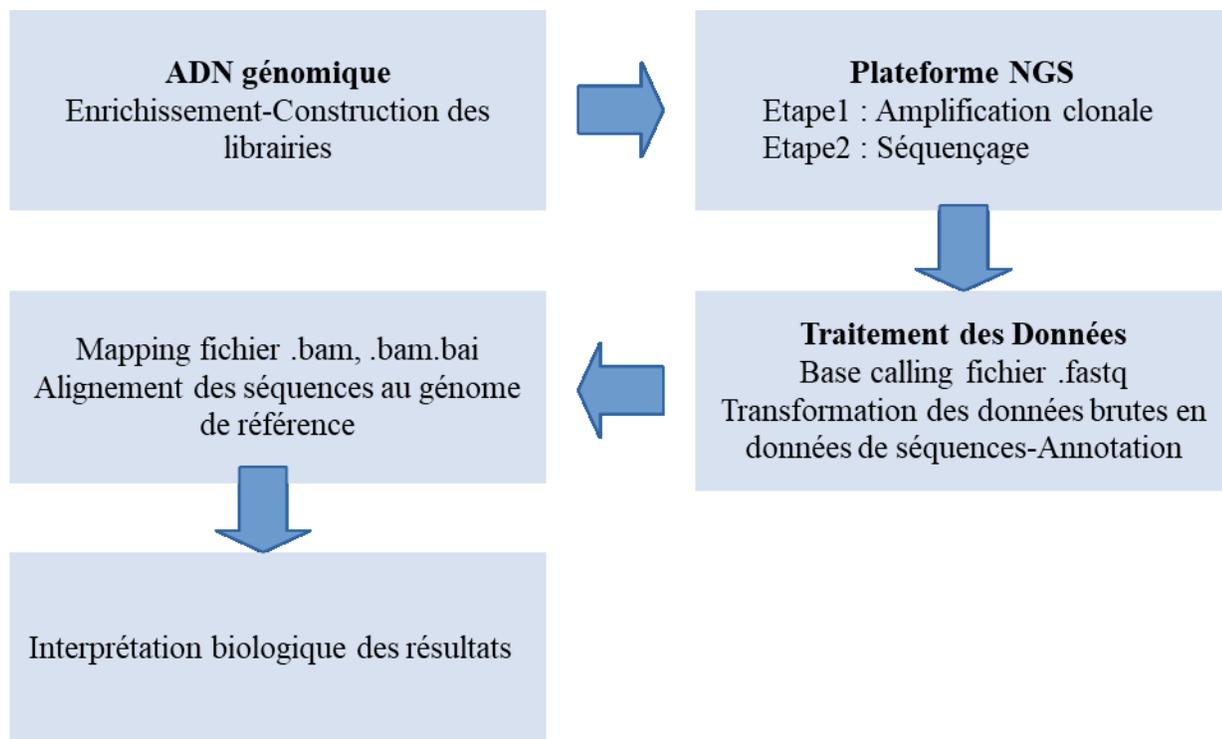
Deux nouvelles stratégies ont été développées avec l'arrivée des NGS. Il s'agit du séquençage de génome entier qui consiste à lire l'ensemble de l'information génétique (3,2 Gb pour le génome humain et 23 Mb pour *P. falciparum* 3D7), et le séquençage d'exome qui se focalise sur les exons et concerne par exemple moins de 2 % du génome humain soit environ 62 Mb.

Bien que le séquençage de l'exome et du génome entier soit de plus en plus courant, il est important de souligner qu'ils ne sont actuellement accessibles que dans certains laboratoires de recherche et/ou laboratoires de diagnostic, car la pratique du séquençage de génome entier dans les laboratoires de diagnostic est encore trop coûteuse en termes d'équipement et de matériel informatique pour l'analyse et le stockage des données.

Pour conclure, le NGS est une technologie qui permet d'établir un lien entre la pratique diagnostique qui consiste à identifier la cause moléculaire d'une pathologie chez un patient, et la recherche, qui tend à décrire de nouvelles causes de la pathologie pour en comprendre les mécanismes.

#### **1.2.4.1. Séquençage en pratique**

Le séquençage à haut débit ou séquençage NGS est basé sur la génération et la lecture en parallèle de millions de petites séquences d'ADN indépendantes». Les données brutes obtenues à partir de cette lecture sont ensuite réorganisées par un traitement informatique pour reconstituer le brin d'ADN cible, avant d'être analysées pour y déceler d'éventuelles variations par rapport à la séquence de référence. De nombreux articles détaillent les principes du séquençage haut débit<sup>94-96</sup>; Ils sont en général identiques. Nous présentons ci-dessous une vision simplifiée et globale des différentes étapes (Figure 7).



**Figure 7** : Les différentes étapes du NGS

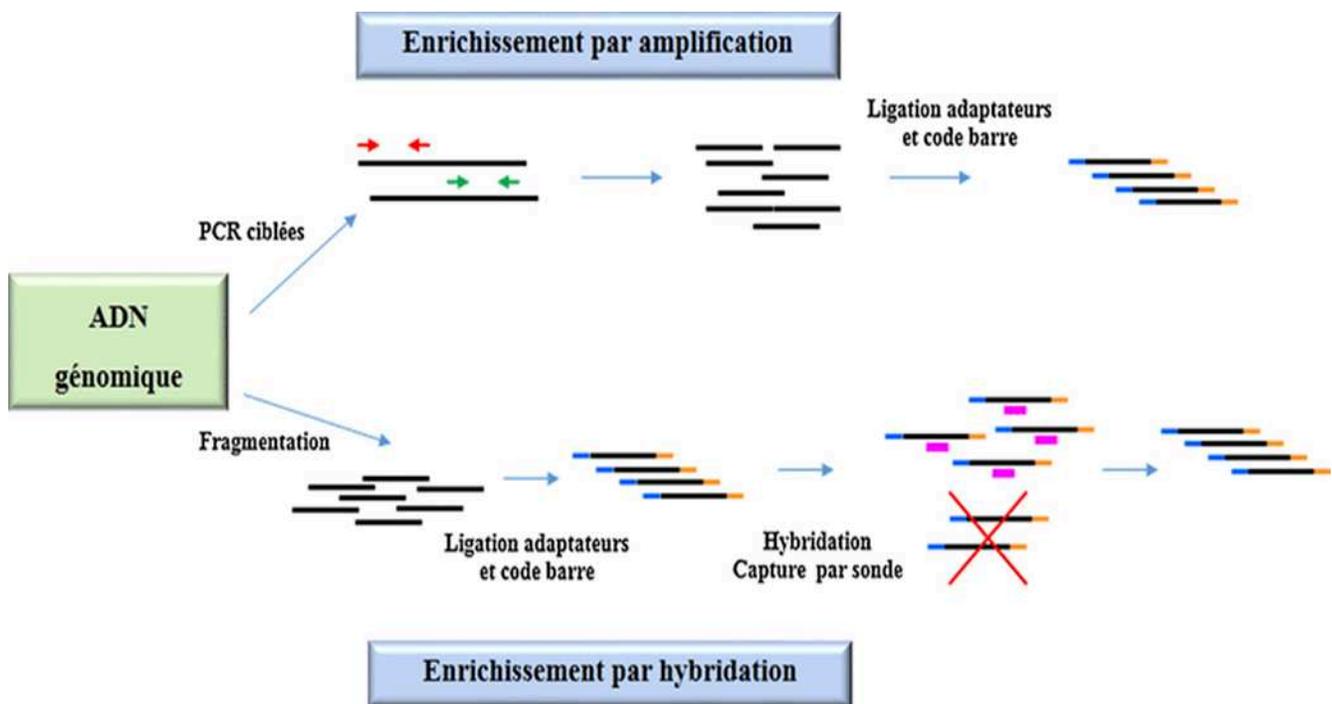
Avant de donner les détails sur les différentes étapes du NGS, il faudra souligner que les méthodes de shotgun et de deep sequencing ont été les deux stratégies utilisées dans la deuxième partie de nos travaux de thèse. Et bien que les différentes étapes évoquées précédemment dans notre vision simplifiée et globale soient identiques pour ces deux méthodes, il est à noter que le deep sequencing comporte deux spécificités retrouvées en amont du processus décrit par rapport à la méthode du shotgun. En effet, le deep sequencing nécessite de cibler des gènes d'intérêt et de les amplifier par PCR avant fragmentation contrairement à la méthode dite shotgun où le génome entier a été directement fragmenté. Pour la suite, à partir de l'étape de fragmentation des amplicons ou du génome entier, le processus a été le même.

#### 1.2.4.1.1. Construction des librairies

La première étape consiste à produire une librairie ou encore une banque de fragments d'ADN ciblés. Cette librairie, mot provenant de l'anglicisme « library » est constituée de millions de petits fragments d'ADN qui sont des copies des régions d'intérêt ou simplement des fragments du génome. Plusieurs kits commerciaux basés sur deux différentes techniques d'enrichissement de l'ADN génomique sont généralement utilisés. La première technique d'enrichissement est basée sur le principe de la PCR-

multiplexe, c'est-à-dire l'amplification de plusieurs fragments dans le même tube. La seconde technique quant à elle est basée sur l'hybridation, ou capture d'ADN. Des fragments de 75 à 250 paires de bases d'ADN génomique sont générés par digestion enzymatique ou par sonication (traitement aux ultrasons). Ces fragments sont hybridés avec des sondes spécifiques des régions d'intérêt : c'est la capture<sup>97</sup>.

A la fin de cette étape, une librairie constituée des régions d'ADN enrichies que l'on souhaite étudier est disponible. Au cours de cette étape, un code barre (petite séquences d'ADN permettant l'identification de l'échantillon d'origine) est attribué à chaque fragment de la librairie. Ce procédé permet par la suite de séquencer plusieurs échantillons en même temps, on parle alors de multiplexage.



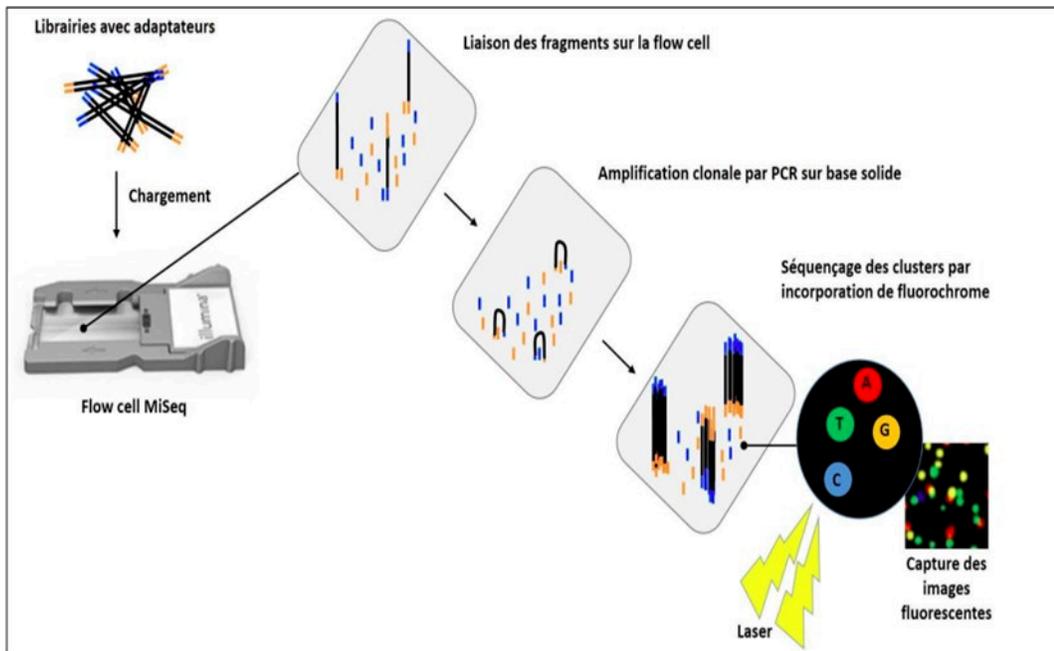
**Figure 8** : Méthodes d'enrichissement de l'échantillon en ADN cible<sup>97</sup>

La constitution des librairies peut se faire de deux façons. Lors d'un enrichissement « par amplification », on cible les régions d'intérêt par PCR multiple (plusieurs fragments amplifiés dans le même tube). Les adaptateurs spécifiques ainsi qu'un code barre sont ajoutés aux produits de PCR.

Avec la méthode « par hybridation », l'ADN est coupé en fragments de 150 -250 bases puis associé aux adaptateurs et au code barre. Des sondes spécifiques des régions cibles (boîtes roses) sont ajoutées pour capturer les fragments ciblés avant une courte étape finale de PCR. Les régions non capturées sont éliminées. PCR : amplification génique<sup>97</sup>.

### 1.2.4.1.2. Séquençage des bibliothèques

Ces bibliothèques sont ensuite séquencées par la plateforme et pour ce faire, il est nécessaire de réaliser une amplification clonale. Cette amplification clonale peut se faire sur une FC et permet de reproduire des milliers de copies de ce fragment au voisinage immédiat de son point d'attachement (Figure 9). Les fragments clonés sont directement séquencés sur la flow cell.



**Figure 9** : Schéma du principe de séquençage sur une plateforme MiSeq (Illumina)<sup>97</sup>

Les bibliothèques produites sont chargées dans la station microfluidique (flow cell). Les différents fragments s'hybrident par leurs adaptateurs spécifiques sur le support pour ensuite être amplifiés et former des clusters (ou clones d'un même fragment). Le séquençage des clusters se fait par polymérisation et incorporation de dNTPs marqués par quatre fluorochromes permettant de différencier les quatre bases. À chaque flux de dNTPs, les données de fluorescence sont recueillies pour identifier les nucléotides incorporés sur chaque cluster. Cette étape du recueil des données est assez longue, car il est nécessaire de capturer la fluorescence de la surface totale de la flow cell en caméra à haute résolution. Les données brutes sont ensuite traduites en données de séquence.

Il est important de noter que toutes les plateformes sont basées sur la capacité à déchiffrer in situ la séquence en bases de chaque fragment pour en acquérir les données en temps réel.

#### 1.2.4.1.3. Traitement informatique des données brutes

Le traitement des données informatiques brutes après séquençage est généralement automatisé sur le serveur de la plateforme. Les données brutes obtenues subissent plusieurs prétraitements suivant des algorithmes qui génèrent des données de séquence au format .FASTQ<sup>98</sup>. Au cours des différentes étapes de prétraitement, ou base calling, une filtration des données est faite pour ne garder que les meilleurs fragments séquencés (*reads*) suivant un score de qualité.

Dans le cas d'un multiplexage, chaque *read* est réassigné à son échantillon d'origine suivant le code barre utilisé. Au final, on obtient des millions de *reads* pour chaque échantillon et ses *reads* sont ensuite alignés sur le génome de référence de l'organisme sur lequel l'on travaille (*P. falciparum* 3D7 v30) grâce à des outils informatiques (BWA par exemple). Ce procédé est appelé le mapping<sup>99</sup>. Après alignement, les données obtenues sont exploitables au format .BAM (Binary Alignment Map). Les fichiers .BAM sont des fichiers d'alignement compressés qui permettent d'accéder aux informations de couverture et de profondeur<sup>100</sup>. La couverture et la profondeur sont deux critères fondamentaux qui permettent d'évaluer la qualité des données de séquençage et doivent être pris en compte pour appréhender tout résultat de séquençage à haut débit.

A partir des fichiers .BAM, l'analyse reste ouverte et dépend des différents objectifs fixés avant le séquençage (mutations, indel, copy number variations, single nucleotide variation etc.).

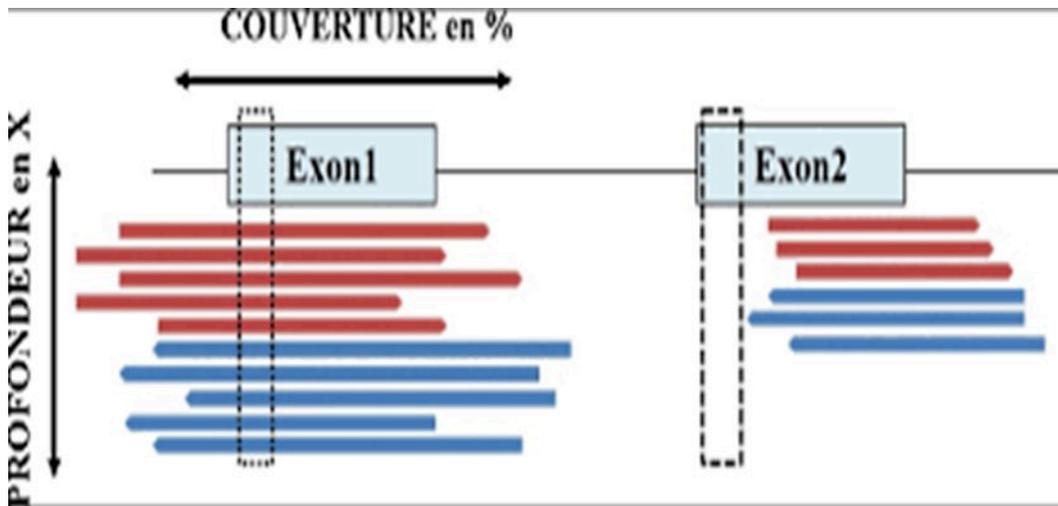
#### 1.2.4.1.4. Profondeur et couverture, les deux paramètres clés du NGS

La profondeur de séquençage est l'un des premiers critères importants à considérer et il représente le nombre de « *reads* » couvrant une position donnée ; elle s'exprime en nombre de fois (X).

Ainsi, une « profondeur de 10X » signifie que la base, ou la région considérée, a été séquencée 10 fois de manière indépendante. Généralement, la profondeur de séquençage est une valeur moyenne sur l'ensemble des régions ciblées. Par exemple, une profondeur minimale de 20X est recommandée par l'European Society of Human Genetic (ESHG)<sup>101</sup> si l'on souhaite détecter des variants à l'état hétérozygote avec une qualité satisfaisante. Par contre, pour *P. falciparum*, une profondeur minimale de lecture de 10X est généralement acceptée.

Le second critère pris en compte est la notion de couverture. Ce critère est également important dans la mesure où il permet de connaître le pourcentage de bases effectivement séquencées par rapport au nombre total de bases ciblées au départ. La qualité globale de l'analyse dépendra du pourcentage de

couverture pour une profondeur minimale fixée ou pour une profondeur moyenne. Par exemple, si une région est couverte à 80% à 20X minimum, cela signifie que 80 % des bases de la région ont été séquencées au moins 20 fois, chacune de manière indépendante (Figure 10). Les résultats de couverture et de profondeur sont liés aux méthodes d'extraction et techniques d'enrichissement utilisées<sup>102</sup>.



**Figure 10** : Couverture et profondeur de séquençage<sup>97</sup>.

Cette figure montre la différence de profondeur de lecture entre l'exon1 et l'exon2.

#### 1.2.4.1.5. Interprétation biologique des données

L'interprétation des résultats obtenus dépend fortement de la qualité des données obtenues à la suite du séquençage. L'obtention de la bonne qualité des données passe globalement par la qualité du matériel biologique extrait (ADN ou ARN) et de la qualité du séquençage. En plus de la qualité du matériel biologique utilisé, l'interprétation des résultats nécessite également une connaissance du gène ou des gènes étudiés et des fonctions de ses produits. Elle est basée sur l'expertise humaine et sur l'utilisation d'outils bio-informatiques et de bases de données, mais aussi des données issues de la littérature.

#### 1.2.4.2. Séquençage et Génome de *P. falciparum*

Au fil des années, les chercheurs ont réalisé que pour contrôler et éradiquer le paludisme, il fallait mieux connaître et comprendre le parasite. En partant de ce fait et pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales qui soutiendront la lutte contre le paludisme, un consortium international (Institute for Genomic Research and Naval Medical Research Center (TIGR/NMRC), Sanger Institute and Stanford University) a été créé en 1996. Son but était de séquencer le génome le génome entier de

*P. falciparum*. Le génome de 3D7 du MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Source Center) a pu donc être entièrement séquencé grâce à la stratégie ‘A whole chromosome shotgun sequencing’. Cette approche a été adoptée parce qu’une stratégie de séquençage du génome entier n’était ni faisable ni rentable avec la technologie disponible au début du projet<sup>103,104</sup>. Le séquençage du génome entier de *P. falciparum* a permis de voir que ce dernier possède 14 chromosomes et la taille de son génome est d’environ 22,8 mégabases (Mb), avec une richesse en A+T extrêmement élevée (80,6%), comparée à celui du génome humain 59% (A + T) et de celui du génome de la bactérie *Escherichia coli* 49% (A + T)<sup>104</sup>. Il a été rapporté que la taille du génome des six espèces du *Plasmodium* humain varie de 23 à 35 Mb réparties sur les 14 chromosomes pour approximativement 5 500 gènes dont 51% affichent un seul intron<sup>105,106</sup> en plus des petites variations observées au niveau du contenu en GC. *Plasmodium*, en plus de son génome nucléaire, possède deux ADNs extra chromosomiques : un ADN mitochondrial de 6-kilobase (kb) et un ADN circulaire de 35-kb logé dans un apicoplaste<sup>106</sup>. Des ARNs de transfert et plusieurs sous-unités ribosomiques 18S-5.8S-28S sont répartis dans les différents chromosomes<sup>103</sup>. Parmi ces sous-unités ribosomiques, la sous-unité 18S est connue pour être utilisée en PCR pour l’identification du genre et des espèces de *Plasmodium*<sup>107</sup>.

### 1.2.4.3. Ressources génomiques de *Plasmodium*

Les informations génomiques, transcriptomiques et protéomiques peuvent permettre de mieux comprendre le parasite et de favoriser la découverte de cibles médicamenteuses dans la lutte contre le paludisme. Ces dernières analyses requièrent une base de comparaison et l’utilisation des différentes technologies de séquençage a permis la production de nombreuses données sur *Plasmodium*. Ces dix dernières années, la quantité et la qualité des séquences obtenues ont augmenté grâce aux progrès des technologies de séquençage et d’assemblage ; créant le besoin de stockage et la mise à disposition du public de ces données à des fins d’analyse.

Plusieurs serveurs de bases de données accessibles au public pour le génome de *Plasmodium*, tels que European Nucleotide Archive (ENA)<sup>108</sup>, GeneDB<sup>109,110</sup>, MalariaGEN<sup>111</sup>, PlasmoDB<sup>112-114</sup> et STRING<sup>115,116</sup> ont été ainsi créés. Dans la section suivante, nous ne mentionnerons que de PlasmoDB car il a été le site le plus utilisé lors de nos travaux.

#### 1.2.4.3.1. PlasmoDB

PlasmoDB pour *Plasmodium* genomics data resource, est la base de données officielle et très utilisée pour le consortium de séquençage du génome de *Plasmodium*<sup>112-114</sup>. Cette base de données est un projet de EuPathDB (Eukaryotic Pathogen genome database) Bioinformatic resource center (BRC), qui en plus des données sur *Plasmodium*, comporte des bases de données pour *Amoeba*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Microsporidia*, *Prioplasma*, *Toxoplasma*, *Trichomonas* et *Kinetoplastida*. PlasmoDB fournit une interface conviviale d'exploration de données pour l'analyse et la visualisation de données produites à l'échelle génomique par la communauté mondiale de recherche sur le paludisme. Cette base de données fournit des informations sur 10 espèces et 13 souches de *Plasmodium* à partir de données de séquençage. Les sources de ces données sont GeneDB, GenBank et les informations fournies par la communauté de recherche sur le paludisme. PlasmoDB fournit des outils pour la comparaison de ces espèces et organismes. Des souches de référence de *P. falciparum* telles que 3D7 et IT4 sont présentes dans la base de données.

La séquence complète de la souche 3D7 est incluse dans PlasmoDB depuis la version 4.0 (2008). Presque chaque année, des mises à jour sont faites sur la version du génome de référence en place pour en créer une nouvelle version. Pour chaque version du génome de référence, PlasmoDB fournit des données aux niveaux génomique et transcriptomique tels que SNPs, CHIP-seq, RNA-seq, des données sur l'expression des protéines (plusieurs étapes du cycle de vie) etc. Les données SNP sont présentes pour plus de plus de 100 isolats et peuvent être utilisées pour des études de population<sup>112,114</sup>.

#### 1.2.4.4. Changement d'échelle pour les analyses en laboratoire : Identification des moléculaires associés à la résistance à quelques antipaludiques

De très nombreuses analyses moléculaires ont requis l'utilisation des méthodes de séquençage de première génération. Auparavant, ces analyses étaient chronophages et coûteuses. Avec l'avènement des méthodes de séquençage de nouvelle génération, ces mêmes analyses sont aujourd'hui devenues routinières. Et bien que très répandues dans les laboratoires de recherche, des efforts restent à faire pour que celles-ci fassent partie intégrante de la routine des laboratoires de diagnostic.

Dans la section (1.1.4.2.2), nous avons parlé des différents médicaments antipaludiques utilisés et de la manière à laquelle nous sommes passés de l'utilisation de la QN à celle de l'artémisinine. La résistance à tous les médicaments antipaludiques largement utilisés a été observée dans la plupart des

régions du monde. Comme chaque médicament possède un mode d'action différent et cible les parasites à différents stades, la compréhension du mécanisme de résistance demeure complexe. Certaines voies de résistance plausibles ont été décrites, mais le processus d'acquisition de la résistance n'est pas complètement compris. Certains marqueurs moléculaires ont été définis sur la base des mutations acquises dans le génome des parasites et associées au processus de résistance sous-jacent pour différents médicaments.

Prenons en exemple le cas de la chloroquine, des mutations non synonymes ont été observées sur trois gènes codant pour des transporteurs au niveau de la membrane de la vacuole digestive en 2004. L'identification de ces gènes était basée sur l'analyse de locus de traits quantitatifs (QTL) de croisements génétiques entre les clones de référence HB3 (sensible) et Dd2 (résistant). Ferdig et ses collègues ont montré que le gène *Pfmdr-1* (*Pf* multidrug resistance 1) sur le chromosome 5, *Pfcrt* (*Pf* chloroquine resistance transport) sur le chromosome 7, et *Pfnhe-1* (*Pf* Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchanger-1) sur le chromosome 13 étaient associés à une sensibilité réduite du parasite à la chloroquine<sup>117</sup>.

Cette comparaison entre les clones de référence (HB3 et Dd2) a permis d'identifier des SNPs non synonymes (8 mutations) dans le gène *Pfcrt* (PF3D7 0709000) du chromosome 7. L'une des mutations, *Pfcrt*-K76T a été trouvée chez tous les parasites résistants à la CQ<sup>57</sup>. En plus, ces résultats ont été confirmés par des études d'association entre le génotype (allèles résistants) et le phénotype (concentration inhibitrice semi-maximale (IC50)) des isolats<sup>118</sup>. Cette résistance pourrait s'expliquer par le fait que *pfcrt* possède une structure de type transporteur au niveau de la vacuole digestive de la cellule, et que cette dernière n'a pas la capacité de transporter la chloroquine protonée hors de la vacuole digestive alors que le mutant *Pfcrt* (perte de la lysine 76 chargée positivement) a acquis la capacité de transporter la chloroquine protonée hors de la vacuole digestive vers le cytosol réduisant ainsi l'excès de chloroquine pour l'hème de la vacuole digestive<sup>118</sup>.

Dans le cas de la Sulfadoxine-Pyraméthamine (SP), les mutations ponctuelles dans le gène de la dihydrofolate réductase (*pfdhfr*) et de la dihydroptéroate synthase (*pfdhps*) ont été vues comme étant associées à la résistance. Pour les parasites résistants à la méfloquine (MQ), plusieurs études (cliniques ou in vitro) ont montré une corrélation entre la résistance à la MQ et l'amplification du nombre de copies de *Pfmdr1*. Ce gène, tout comme *Pfcrt*, code pour un transporteur au niveau de la membrane de la vacuole digestive du parasite<sup>119</sup>.

Il faut noter que si la résistance à la chloroquine a été identifiée dès les années 1960 l'identification du marqueur moléculaire lié à cette résistance n'a été faite que 40 ans plus tard à un moment où cette

dernière avait envahi l'ensemble des zones d'endémie palustres africaine. Par contre, en ce qui concerne la résistance à l'artémisinine, le temps entre sa suspicion clinique et l'identification du marqueur de résistance a été de moins de 10 ans. Ceci a permis la prise en compte par les autorités sanitaires de l'urgence à contenir cette résistance dans l'Asie du sud-est (projet d'élimination du paludisme dans le bassin du Majong) et la mise en place d'un réseau de surveillance de la résistance en Amérique et en Afrique afin de pouvoir protéger l'efficacité de cet antipaludique majeur.

En conclusion, il apparaît beaucoup plus simple aujourd'hui d'identifier des populations parasitaires résistantes aux différentes molécules couramment utilisées dans le traitement du paludisme grâce aux différents marqueurs moléculaires identifiés et associés à la résistance à chacune des molécules sur lesquelles nous nous focaliserons au cours de ce travail de thèse.

La méthode de séquençage « Sanger », qui consiste en une approche gène par gène, est la méthode la plus utilisée à ce stade, que ce soit en laboratoire de diagnostic qu'en recherche. Bien que cette technique génère une information de séquence en fonction de l'objectif fixé et permette l'identification des mutations non-synonymes, elle demeure à ressource limitée. D'où l'importance aujourd'hui de l'utilisation du NGS en recherche comme en diagnostic qui, au contraire du 'Sanger', génèrent une réserve d'information qu'il est possible d'exploiter en fonction des besoins. En ce qui concerne cette méthode, on n'est limité que par la capacité (ou les choix) d'analyse et son coût.

#### **1.2.4.5. Taux de mutation des gènes d'intérêt**

##### **1.2.4.5.1. Concept de la sélection par pression médicamenteuse**

La résistance aux antipaludiques résulte de mutations spontanées qui induisent une modification de la structure et de l'activité au niveau moléculaire, de la cible du médicament au sein du parasite ou empêchent ce médicament de parvenir à cette cible. Le caractère spontané de ces mutations a été d'ailleurs corroboré par la découverte dès 1986 en Afrique de l'Ouest de souches de *P. falciparum* naturellement résistantes *in vitro* à la méfloquine<sup>120</sup>, une drogue absente du continent africain à l'époque. Les mutants résistants circulent donc au sein des populations avec une très faible proportion tant qu'il n'y a pas de pression de sélection. On désigne par pression de sélection médicamenteuse, lorsque la concentration de l'antipaludique utilisé est suffisante pour inhiber la multiplication des souches sensibles mais insuffisante pour bloquer celle des parasites mutants. Les mutations en général, peuvent être mis en évidence d'abord *in vitro* puis, avec le temps, lorsque leur proportion augmente, ils peuvent être détectés *in vivo* d'abord

chez les sujets non immuns (expatriés, enfants de 0 à 5 ans vivant en zone d'endémie) puis chez les sujets semi-immuns.

L'utilisation massive ou progressive d'un antipaludique contribue à sélectionner les mutants résistants dont la proportion par rapport aux souches sensibles va augmenter jusqu'à atteindre le seuil de détection microscopique puis le seuil clinique. Le processus de sélection est par ailleurs facilité par la présence de concentrations plasmatiques infra thérapeutiques de l'antipaludique et la présence au niveau des allèles mineurs des mutations associées à la résistance. On connaît encore mal l'évolution et le passage de ces mutations de l'allèle mineur à l'allèle majoritaire bien que les bases moléculaires de la résistance soient de plus en plus compréhensibles

## **Partie II-Relation, contexte et objectif de la thèse**

Le paludisme est une maladie évitable dont on guérit quand il est traité. Cette affection est évitable dans le sens où elle peut être prévenue au moyen d'antipaludiques.

A cet effet, l'OMS recommande i) une chimioprophylaxie qui supprime le stade sanguin de l'infection palustre pour les voyageurs ; ii) l'administration d'au moins trois doses de TPI-SP aux femmes enceintes vivant dans des zones où la transmission est modérée à forte et iii) et trois doses de TPI-SP en même temps que les vaccinations systématiques pour les nourrissons vivant en Afrique dans des zones de forte transmission<sup>3</sup>.

La guérison complète du paludisme requiert un traitement approprié afin d'éviter qu'un paludisme non compliqué n'évolue vers une forme grave potentiellement mortelle. Dans le cas du traitement, l'OMS recommande les CTAs en première ligne.

Les CTAs constituent le pilier du traitement recommandé contre le paludisme à *P. falciparum*, et puisqu'aucun autre antipaludique ne devrait être mis sur le marché avant plusieurs années, leur efficacité doit être préservée. Par conséquent, l'OMS a pris des mesures afin d'éviter l'émergence des résistances aux CTAs.

La résistance aux antipaludiques est un problème récurrent qui a débuté avec la résistance des parasites aux précédentes générations de médicaments comme la CQ et la SP au cours des années 1960 et 1970, compromettant les efforts de lutte antipaludique et inversant la tendance des progrès accomplis en matière de survie de l'enfant et de la femme enceinte. Le répit octroyé par l'artémisinine et ses dérivés s'est achevé avec à nouveau l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Asie du Sud Est mais aussi et surtout son émergence indépendante en Afrique de l'Est (Rwanda et Ouganda) contrairement au processus d'expansion de la CQ et de la SP<sup>20,21</sup>.

La multiplicité des infections et la diversité génétique sont tout autant de facteurs importants qui favorisent l'émergence des résistances aux antipaludiques entravant les efforts d'éradication du paludisme à travers le monde. Ces facteurs ont un impact sur i) le traitement proposé, ii) les essais de médicaments, iii) l'acquisition de l'immunité et iv) le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme.

Les rapports d'étude de Jelinek et al, 1999 et de Meyer et al, 2002 ont montré qu'une diversité génétique accrue des parasites du paludisme circulant dans une population augmente le potentiel de sélection de la résistance aux médicaments<sup>121</sup>.

Aussi, dans les essais de médicaments, il est important de détecter tous les clones, car un seul pourrait être résistant aux médicaments et entraîner une recrudescence<sup>122</sup>. Il s'avère donc nécessaire de

prendre en compte tous les facteurs pouvant être impliqués dans la sélection d'une mutation associée à la résistance à des antipaludiques connus.

L'émergence de la résistance aux CTAs soulève des inquiétudes dès lors que le mécanisme de résistance des parasites n'est pas entièrement compris et qu'il n'existe pas de nouvel agent antipaludique pour remplacer les CTAs. Il devient donc essentiel de préserver l'efficacité des antipaludiques dans la lutte contre la maladie. Leur efficacité doit être régulièrement suivie pour permettre aux pays d'endémie palustre d'adapter leur politique de traitement, d'assurer la détection précoce de la résistance et de prendre les mesures adéquates là où elles semblent nécessaire.

La surveillance suppose, dans notre cas, de suivre l'évolution de la résistance aux antipaludiques recommandés par l'OMS tels que : la SP pour le TPI-SP chez la femme enceinte et les CTAs pour le traitement du paludisme simple et du paludisme grave.

Actuellement, de nombreux pays où la transmission du paludisme est modérée à forte ne disposent pas de systèmes de surveillance adéquate. Heureusement, des études antérieures ont permis l'identification de *pfk13* comme marqueur moléculaire de la résistance à l'artémisinine et des gènes, *pfdhps* et *pfdhfr* associés à la résistance à la SP<sup>71,123</sup>. Ces marqueurs sont particulièrement utiles pour distinguer les populations parasitaires résistantes et sensibles.

Ces marqueurs sont généralement utilisés avec des techniques de PCR et le séquençage Sanger, limitant l'information à l'échelle du gène. Alors qu'avec l'avènement des techniques de séquençage de nouvelles générations, étudier les populations à l'échelle du génome semble beaucoup plus approprié et intéressant. Ces nouvelles techniques ont pour elles l'avantage de générer un maximum de données capable de renseigner sur la clonalité des isolats (poly-clonalité, clone majoritaire et minoritaire), le génotype de l'isolat (résistant ou sensible) par rapport à n'importe lequel des antipaludiques. Ceci afin de mieux comprendre la mise en place du mécanisme de résistance des parasites aux antipaludiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressées à la sélection des mutations associées à la résistance de deux antipaludiques (SP et artémisinine) chez des patients traités à court et moyen terme. Ces deux antipaludiques ont été notamment recommandés par l'OMS comme TPI-SP chez la femme enceinte et comme traitement de première ligne du paludisme simple à grave (artémisinine et ses dérivés) chez les enfants âgés de moins de cinq ans.

Pour mener à bien nos objectifs, nous avons participé et utilisé les données de deux études mises en place dans deux pays d'Afrique subsaharienne endémiques au paludisme : le Ghana et le Bénin (deux pays voisins mais avec des systèmes de santé différents). Le projet mené au Ghana s'est intéressé à la

couverture de la prise de TPI-SP chez des femmes enceintes, tandis que celui mené au Bénin sur les enfants s'est intéressé à la dynamique du génome de *P. falciparum* au cours d'un traitement à base d'artémisinine (Arthémether Lumefantrine dans le cas du paludisme simple et de l'artésunate en intraveineux (IV) dans le cas du paludisme grave).

**Partie III-Paludisme dans la zone Afrique de l'Ouest : Cas  
du Ghana et du Bénin**

## Organisation de la thèse en alternance

La majeure partie de ce travail de thèse a été réalisée grâce à une bourse de trois ans et demi octroyée par le Labex Parafrap (Sud) en collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Institut Cochin (Inserm). Ce financement nous a permis d'effectuer pendant la durée de cette thèse des alternances entre les équipes de l'IRD, du Noguchi Memorial Institut For Medical Reseach (NMIMR) à Accra au Ghana, de l'Institut Cochin (Inserm) à Paris en France et du Centre d'étude et de recherche sur le paludisme associé à la grossesse et à l'enfant (CERPAGE) à Cotonou (Bénin). Les données exploitées dans ce manuscrit proviennent de deux projets mis en place dans deux pays voisins de l'Afrique Sub-saharienne auxquels nous avons participé. Ces deux pays sont endémiques au paludisme et sont proches de par leur géolocalisation mais possèdent des systèmes de santé très différents.

Le projet mis en place au Ghana est dénommé « Malaria – helminth co-infection in Ghana: Issues and challenges in vaccine développement against placental malaria » (MAHEVA) et celui implémenté au Bénin est appelé « Identification de biomarqueurs à usage pronostic du paludisme grave du neuropaludisme » (BIOCER). L'intégration des données MAHEVA dans nos travaux a été intéressante dans la mesure où elle a permis de suivre de façon réelle des femmes enceintes sous TPI-SP et la sélection de parasites portant des mutations associées à cette combinaison thérapeutique, une identification faite par la méthode Sanger. BIOCER nous aura permis d'étudier la pression exercée par les CTAs sur le génome des parasites au cours d'un paludisme grave ou simple chez les enfants âgés de moins de cinq ans grâce aux technologies NGS. Ces deux projets nous ont permis d'étudier la sélection de parasites portant des mutations associées à des médicaments comme la SP mais aussi les CTAs et ce, grâce à deux types de séquençage : Sanger et Illumina. Nous subdiviserons donc cette troisième partie en deux chapitres. Le chapitre 1 qui fera l'état des lieux du paludisme au Ghana avec un cas concret qui est l'exemple du projet MAHEVA ; et le chapitre 2 qui fera également l'état des lieux du Bénin avec un exemple qui portera sur le projet BIOCER.

## Chapitre 1-Paludisme au Ghana: Cas pratique du projet MAHEVA

### 3.1.1. Justification du choix du Ghana

Le paludisme est endémique et pérenne dans toutes les régions du Ghana, les variations saisonnières étant plus prononcées dans le nord. Le Ghana peut s'enorgueillir d'un système électronique de gestion des informations sanitaires de district mis à jour, qui a amélioré la qualité des données sur le paludisme, les rapports en temps voulu et leur exhaustivité. La confirmation en laboratoire s'est également considérablement améliorée, avec 77 % des cas de paludisme en consultation externe confirmés en 2016. Le Ghana a également atteint le taux le plus élevé de traitement préventif intermittent pour les femmes enceintes en Afrique subsaharienne (78%)<sup>124</sup>.

#### 3.1.1.1. Paludisme au Ghana

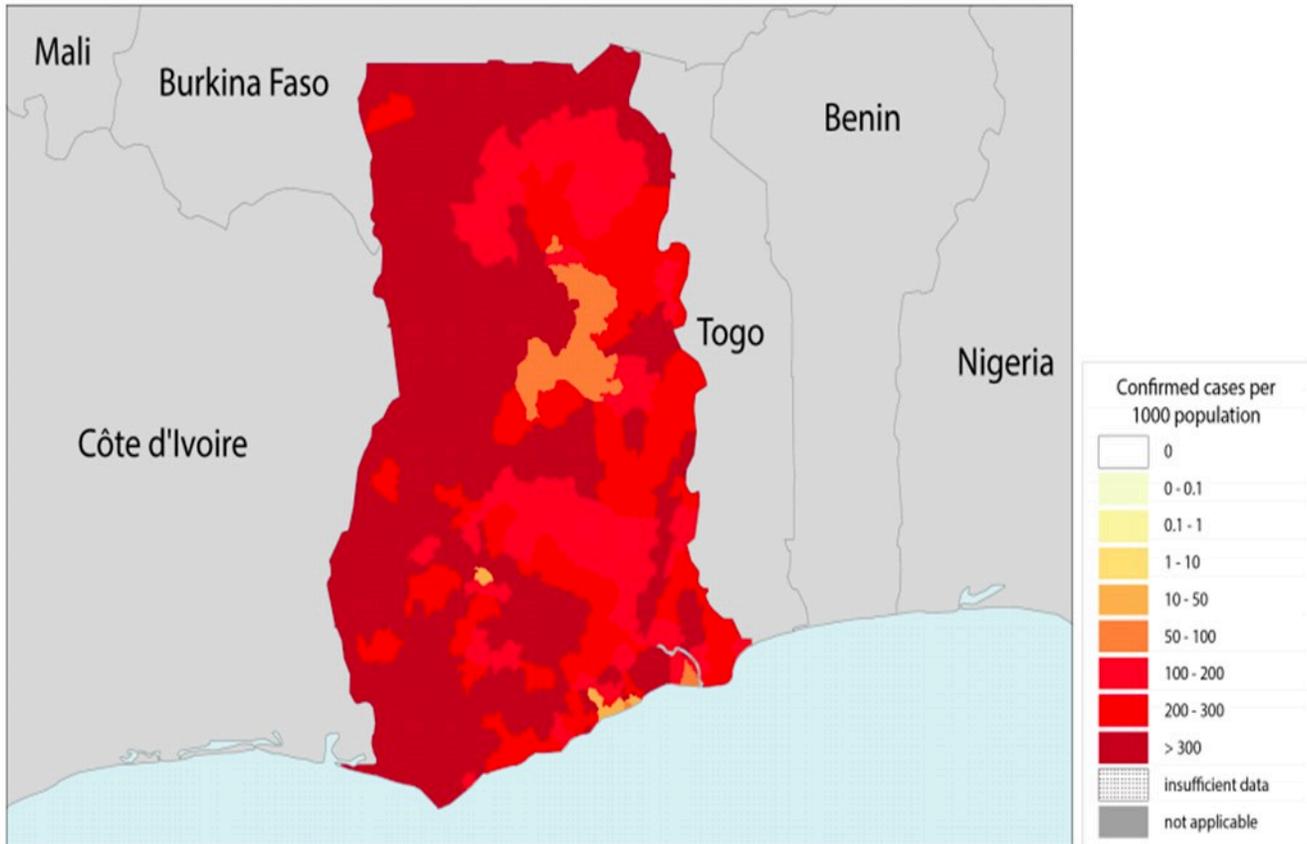
Avec une superficie de 238 537 km<sup>2</sup>, le Ghana est un pays situé en Afrique de l'Ouest (référence). On trouve deux zones climatiques distinctes au Ghana avec des variations qui sont loin d'être uniformes d'une région à une autre. Au Sud, le climat est équatorial et l'humidité est très élevée (80% ou plus durant toute l'année) avec deux saisons des pluies et deux saisons sèches. Tandis qu'au Nord, le climat est tropical avec une saison sèche qui commence en novembre et se prolonge jusqu'en mars.

La situation géographique et climatique du Ghana fait qu'il est sujet à des pathologies tropicales variées, avec une prédominance des affections épidémiques et endémiques dont la plus importante est le paludisme. Cette affection est endémique et pérenne dans toutes les régions du pays avec plus de 80 % des cas de paludisme provoqués par *P. falciparum*. Les vecteurs du paludisme retrouvés en majorité au Ghana sont : *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. Arabiensis*<sup>125</sup>.

La performance du système informatisé dont le Ghana s'est doté a permis aujourd'hui d'améliorer le système de santé et la qualité des données des rapports produits sur le paludisme. Ces rapports ont permis à l'OMS d'avoir une idée exhaustive de l'incidence du paludisme au Ghana et a ainsi permis de le classer comme l'un des 15 pays ayant le fardeau du paludisme le plus élevé au monde avec environ 3% des cas de paludisme et des décès qui y sont associés. Le Ghana a déclaré la plus grande augmentation de cas, (500 000 nouveaux cas) entre 2017 et 2018, ce qui représente une augmentation de 5% par rapport à 2017 (de 213 à 224 pour 1 000 personnes au sein de la population à risque) et de 3% par rapport à 2015. Par contre, le nombre de décès a chuté de 12%, passant de 0,42 à 0,37 pour 1 000 personnes à risque<sup>124</sup>.

Le nombre de cas déclarés de paludisme parmi les enfants de moins de cinq ans a augmenté progressivement de 12% en 2016 à 33% en 2017 grâce à un meilleur accès aux tests diagnostic.

Enfin, le Ghana a obtenu le taux de TPI-SP le plus élevé d’Afrique subsaharienne (78%) avec une meilleure adhésion à la nouvelle politique d’utilisation du TPI-SP qui est passée de 39% à 60%<sup>124</sup>.



**Figure 11:** Rapport mondial sur le paludisme en 2018 ; Profil épidémiologique du Ghana

Toutes les régions du Ghana sont endémiques au paludisme avec un nombre de cas de paludisme confirmés compris entre au moins 100 et 200

### 3.1.1.1.1. Système sanitaire du Ghana

Le Ghana est l'un des pays les plus avancés d'Afrique en matière de soins de santé. Le pays dispose d'une pratique médicale élevée, du moins là où elle est disponible et d'un système national d'assurance maladie (NHIS) qui a remplacé le système de santé "cash and carry" existant en 2003. Le nouveau système national d'assurance se concentre sur les besoins élémentaires en soins de santé des populations

: les traitements contre le paludisme, la diarrhée, les maladies respiratoires, le diabète et l'hypertension, entre autres.

De façon pratique, le système de santé ghanéen se décompose en quatre niveaux. Le premier niveau qui est constitué des hôpitaux universitaires autonomes (TH). Ce sont des hôpitaux de référence nationaux ayant pour mandat de gérer des problèmes de santé complexes, de mener des recherches et de former du personnel. Chaque TH est lié à une université afin d'en améliorer les fonctions. Ensuite, on trouve des hôpitaux régionaux (RH) au deuxième niveau. Ceux-ci fournissent un niveau secondaire des soins de santé spécialisés et servent de référence pour chacune des 16 régions politiques du pays<sup>126</sup>.

Concernant le troisième niveau, il y a les hôpitaux de district (primaires) qui servent de centres de référence et fournissent des soins de santé de base et d'urgence à des populations de 100 000 à 200 000 habitants. Chaque district est ensuite divisé en sous-districts de santé desservis par des centres de santé (HC) qui fournissent des services curatifs et préventifs de base pour environ 20 000 habitants. Ces sous-districts de santé dans les zones urbaines voient leur capacité souvent renforcée et sont alors connues sous la dénomination de polycliniques.

Au bas de la hiérarchie des prestations de services de santé se trouvent les services de santé communautaires et de planification (CHPS). La mise en place des CHPS constitue la principale stratégie pour la mise en œuvre des soins de santé primaires de base au niveau communautaire. Ils sont mandatés pour fournir principalement des services de prévention et de traitement des affections mineures avec la vente libre de médicaments pour un nombre de ménages compris entre 750 et 5 000<sup>127</sup>. Cependant, il a été rajouté aux CHPS une stratégie de gestion intégrée des cas dans la communauté (iCCM), correspondant au niveau le plus bas de prestation de soins de santé dans le pays. Elle est mise en œuvre par l'intermédiaire d'agents communautaires (AC) sélectionnés par la communauté.

#### **3.1.1.1.2. Prise en charge du paludisme au Ghana**

Entre les années 1950 et 2000, l'utilisation de monothérapies incluant la chloroquine et d'autres médicaments tels que la quinine et la méfloquine était très répandue jusqu'à ce qu'une résistance généralisée des parasites à ces médicaments soit signalée. Un changement de politique a donc été recommandé par l'OMS en 2004, avec l'adoption en première ligne des CTAs. Au Ghana, ce fut l'artésunate-amodiaquine qui fut utilisé la première fois en première ligne, pour le traitement du paludisme non compliqué. Par la suite, cette politique de traitement a été révisée à deux reprises, en 2007 et 2009, pour inclure l'artémether-luméfantine et la dihydroartémisine-pipéraquline<sup>128</sup>.

Selon la troisième édition du ‘Guidelines for case management of malaria in Ghana’ édité en 2014, ce sont finalement trois combinaisons à base d'artémisinine (Artésunate-Amodiaquine (AS-AQ); Artéméther-Lumefantrine (A-L); Dihydroartémisinine-Piperaquine (DHAP)) qui ont été sélectionnées pour être utilisées au niveau national pour le traitement du paludisme, conformément à la dernière politique de traitement révisée (2014). Cependant, les recommandations diffèrent selon le type de paludisme et la disponibilité des différentes molécules.

#### **3.1.1.1.2.1. Recommandations thérapeutiques dans le cas du paludisme simple**

Les trois CTAs précédemment citées sont utilisées dans le traitement de tous les cas de paludisme simple et sont sans danger pour les enfants (à l'exception de l'utilisation de l'A-L chez les enfants âgés de moins de six mois). Les doses thérapeutiques indiquées sont administrées par voie orale et dépendent de l'âge et du poids du malade.

#### **3.1.1.1.2.2. Recommandations thérapeutiques dans le cas du paludisme grave**

Après une évaluation clinique rapide et une confirmation parasitologique du diagnostic, des doses parentérales complètes d'un antipaludéen approprié doivent être commencées sans délai.

Le traitement parentéral permet d'obtenir des concentrations sériques adéquates dans le sang aussi rapidement que possible dans un premier temps. Les options disponibles sont par ordre de préférence : Artesunate en injection intra veineuse ou intra musculaire (IV/IM), Artéméther IM, Quinine IV/IM. Dans le cadre du traitement du paludisme grave ou sévère, il est recommandé :

- De l'Artesunate à 2,4 mg/kg de poids corporel administré en IV à l'admission (temps =0), à 12 heures et 24 heures post-admission, puis toutes les 24 heures. La durée totale doit être de sept jours au maximum.
- L'artéméther quant à lui, est administré en IM à une dose de 3,2 mg par kg de poids corporel comme dose de charge, puis de 1,6 mg/kg de poids corporel une fois par jour pendant cinq jours. Cependant, il faut administrer un traitement complet de CTA une fois que le patient est capable de tolérer la médication par voie orale ou après au moins 24 heures d'injection intramusculaire.
- Et enfin la quinine qui est utilisée en IV ou en IM.

- La quinine peut être administrée en IV à faible débit par dose de 10 mg de chlorhydrate de quinine par kg de poids corporel (dose maximale 600 mg) toutes les 8 heures dans 5-10 ml/kg de solution saline dextrose ou dans 5 % de dextrose sur 4-8 heures.

La vitesse de perfusion ne doit pas dépasser 5 mg de sel par kg de poids corporel par heure.

- La quinine peut être également administrée par voie intramusculaire (IM) profonde à raison de 10 mg/kg de poids corporel (dose maximale de 600 mg) toutes les 8 heures.

#### **3.1.1.1.2.3. Recommandations dans le traitement des cas particuliers**

Au cours du 1er trimestre, il est recommandé d'utiliser de la quinine pour le traitement du paludisme de la femme enceinte. La combinaison Artésunate-amodiaquine ou artéméther-luméfantrine peut être utilisée aux 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestres de la grossesse.

#### **3.1.1.2. Cas pratique du projet MAHEVA**

Malaria – helminth co-infection in Ghana: Issues and challenges in vaccine development against placental malaria (MAHEVA) est un projet qui a débuté en 2016 et a pris fin en 2019. Il s'inscrit dans l'objectif de la Jeune Equipe Associée à l'IRD (JEA) qui était de renforcer les interactions entre les chercheurs du Sud (NMIMR) et du Nord (IRD), notamment dans le cadre d'un partenariat émergent entre le Ghana et l'UMR261/IRD. Les résultats issus de ce projet sont toujours en cours de valorisation.

##### **3.1.1.2.1. Description du Projet MAHEVA**

MAHEVA est né de la volonté de la JEA de répondre à une question qui était de savoir si une infection helminthique concomitante affecterait l'acquisition et le maintien de l'immunité protectrice contre le paludisme placentaire car les efforts pour mieux comprendre et réduire les conséquences du paludisme pendant la grossesse ont conduit les chercheurs de l'UMR261/IRD, avec leurs collaborateurs, à la découverte de l'antigène VAR2CSA qui est actuellement en développement pour le vaccin contre le paludisme gestationnel.

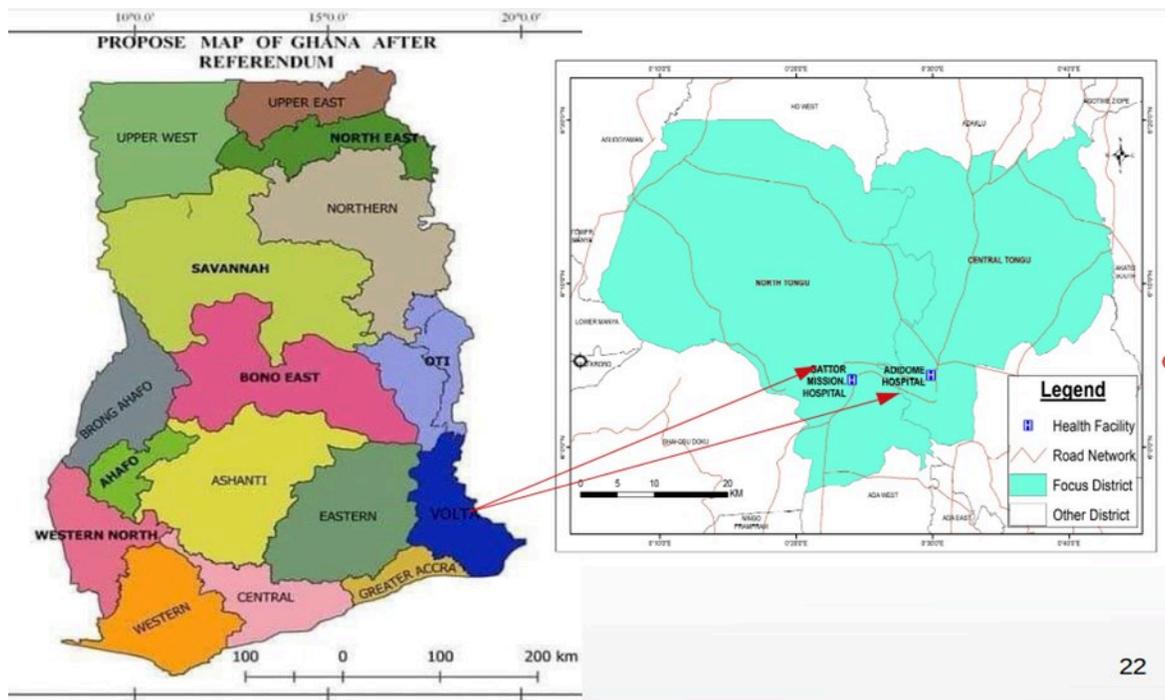
En effet, dans les pays d'Afrique subsaharienne comme le Ghana où le paludisme à *P. falciparum*, les infections helminthiques et la schistosomiase sont toutes endémiques et les co-infections fréquentes. Les femmes enceintes – en particulier les primigestes – sont plus susceptibles d'être infectées par *P. falciparum* que celles qui ne le sont pas avec des conséquences telles qu'un retard de croissance intra-utérin (RCI), un faible poids de naissance (FPN), un accouchement prématuré (AP) et la mortalité néonatale. Dans le contexte de la co-infection paludisme/helminthes, des études récentes ont montré que l'infection par *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*) et *Trichuris trichura* (*T. trichura*) était associée à une diminution des niveaux d'anticorps cytophiliques dirigés contre les antigènes du candidat vaccin de *P. falciparum* : Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1), MSP-3, Glutamate Rich Protein (GLURP) et GMZ-2. Or, peu d'études ont évalué les effets des co-infections *P. falciparum*-helminthes pendant la grossesse sur l'anémie maternelle et sur la survenue de la grossesse. Par conséquent, ce projet qui implique le NMIMR et l'IRD a tenté de répondre à ces questions dans le but de générer des informations essentielles pour soutenir davantage les efforts visant à développer un vaccin efficace contre le paludisme placentaire.

Le projet MAHEVA s'est déroulé de Novembre 2016 à Mars 2019 dans deux zones endémiques de la Volta région au Ghana (Battor et Adidome). Ces deux communes étaient distantes de 50km environ. Battor est une zone semi-rurale et Adidome une zone rurale (Voir figure 12).

Il s'agissait d'un suivi longitudinal d'une cohorte de 1 000 femmes enceintes recrutées sur les deux sites (500 sur chaque site). Ces femmes étaient suivies passivement et on espérait en retrouver 500 à l'accouchement soit 250 par site. Pour participer à cette étude, les femmes devaient être recrutées au cours de leur première consultation prénatale, avoir une température  $>39^{\circ}\text{C}$  et signer le formulaire de consentement écrit et éclairé.

MAHEVA a reçu l'aval du conseil d'examen institutionnel du Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR) et du comité d'examen éthique du Ghana Health Service.

Au cours de la première consultation prénatale et à l'accouchement, les données biologiques et biochimiques (sang périphérique, sang du cordon, sang placentaire, selles, urines), cliniques (taille, poids, âge, température, pression etc...) et parasitologiques (ADN parasitaire extraits à partir du sang) ont été recueillies. Lorsqu'une infection était détectée au cours du recrutement, que ce soit à l'inclusion ou à l'accouchement, les femmes étaient systématiquement traitées selon les recommandations nationales du ministère de la santé ghanéenne.



**Figure 12:** Sites d'étude du projet MAHEVA au Ghana<sup>126</sup>.

Les études ont été menées dans deux hôpitaux se trouvant dans deux communautés de la région Volta du Ghana. Ils sont distants d'une cinquantaine de km.

Les analyses hématologiques et biochimiques étaient réalisées au niveau des laboratoires de chaque site. Les échantillons biologiques restant étaient convoyés de façon hebdomadaire pour la réalisation des analyses parasitologiques et les études immunologiques dans les laboratoires du NMIMR à Accra.

Pour notre part, nous avons intégré l'équipe à partir de Septembre 2017 et nous nous sommes focalisés sur le volet « Paludisme du projet MAHEVA » dans l'objectif d'étudier l'**Évolution adaptative des isolats de *P. falciparum* ghanéens au cours du traitement préventif intermittent pendant la grossesse**. Les données parasitologiques de la partie paludisme du projet sont celles exploitées dans cette partie de notre travail.

### 3.1.1.2.2. Echantillonnage

Nous avons choisi sur la base de nos objectifs de départ, de travailler dans cette thèse à deux moments de la grossesse (première consultation prénatale et accouchement) sur des sous-populations issues de la cohorte MAHEVA.

Au total, 692 femmes ont été incluses lors de leur première visite prénatale et 499 femmes ont été incluses à l'accouchement. Des prélèvements de sang veineux ont été effectués chez toutes les femmes. A ce sang veineux, du sang de cordon et du sang placentaire ont été prélevés également chez les femmes à l'accouchement. Des confettis ont également été réalisés. Des travaux de laboratoire ont été réalisés en utilisant la microscopie pour les examens parasitologiques (gouttes épaisses et frottis sanguins) et les techniques de biologie moléculaire (notamment l'extraction d'ADN et l'amplification par PCR ainsi que le séquençage des produits de PCR). Les femmes à l'accouchement ont été subdivisées en trois groupes selon la prise de TPI-SP. Le groupe de celles qui n'ont pris aucune dose ; le groupe de celles qui ont pris une à deux doses et celles qui ont des doses supérieures ou égales à trois. Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique.

### **3.1.1.2.3. Génotypage des isolats ghanéens**

#### **3.1.1.2.3.1. Réalisation des confettis, extraction d'ADN et PCR**

##### **➤ Réalisation des confettis, extraction d'ADN**

Pour chaque patiente chez qui des prélèvements (sang veineux, sang du cordon, et sang placentaire) ont été effectués, trois gouttes de 50 µL de sang total ont été déposées sur du papier filtre Whatman 3 MM. Les confettis ainsi réalisés ont ensuite été séchés et convoyés au NMIMR où des techniques de biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR et séquençage) ont été réalisées.

Les confettis ont été découpés en fines tranches à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une pince stérilisées à l'éthanol 70°C après chaque usage. Les découpes ont été déposées dans un tube stérile d'Eppendorf® 1,5 mL à l'aide de pinces. Le tube contenant les tranches de confettis a ensuite été étiqueté au code de l'échantillon correspondant. Le découpage a été réalisé dans une salle d'extraction d'ADN génomique de *P. falciparum*. Le découpage et la mise en tube des découpes ont été réalisés avec une paire de ciseaux et une pince stérilisées à l'éthanol 70°C avant et après utilisation pour limiter les contaminations éventuelles. L'ADN plasmodial extrait à partir des confettis de sang a été effectuée par la méthode au Chelex®100<sup>129,130</sup>. Des découpes fines de confettis de sang ont été immergées dans 1 mL de tampon de lavage (1 000 µL de PBS 1X plus 50 µL de saponine 10%) puis incubées à 4°C pendant une nuit. Le tampon de lavage a été retiré puis un second lavage a été effectué avec une incubation de 30 min. Ce tampon de lavage a été également retiré. Puis, un volume de 150 µL d'eau stérile plus 50 µL de solution de Chelex-100 à 20% (poids / volume) (Bio-Rad, n ° de catalogue. 1422832) a été mis dans un

tube de centrifugation de 1,5 mL et chauffé à 100 °C pendant 10 min. Le tube fermé a été vortexé toutes les 2 min pendant 30 secondes. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min, et le surnageant a été recueilli dans un nouveau tube eppendorf (1,5 mL). Ce surnageant a été centrifugé à nouveau à 13 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant de cette deuxième centrifugation a été délicatement recueilli dans un nouveau tube eppendorf et utilisé immédiatement dans la réaction d'amplification par PCR ou conservé à -20 °C. L'ADN ainsi extrait a été quantifié au nanodrop.

### ➤ *qPCR, PCR et séquençage Sanger*

Deux types d'amplification ont été réalisées : une nested PCR et une qPCR.

Dans cette étude, nous avons identifié les infections à *P. falciparum* grâce à la qPCR ciblant l'ARN 18S. La présence de *P. falciparum* a été testée en doublons après une amplification de 40 cycles<sup>131,132</sup>. De l'ADN issu de dilutions successives d'une culture d'érythrocytes infectées par *P. falciparum* a permis de générer une courbe standard. La parasitémie de nos échantillons a été déterminée par extrapolation des seuils de cycle (Ct) en se basant sur cette courbe. Les échantillons sans amplification (aucun seuil de cycle détecté) ont été considérés comme négatifs. L'ADN purifié de la souche parasitaire 3D7 a été utilisé comme contrôle positif, tandis que le contrôle négatif sans ADN a été utilisé dans toutes les réactions.

Une fois l'identification des infections à *P. falciparum* effectuée, l'amplification et le génotypage des gènes *pfdhfr* et *pfdhps* ont été réalisés sur un sous ensemble des échantillons considérés comme positifs à la qPCR. Les séquences des gènes *pfdhfr* (698 pb) et *pfdhps* (647 pb) ont été amplifiées à l'aide d'une nested PCR tel que décrit précédemment (référence). Les séquences d'amorces de même que les protocoles d'amplification utilisés sont référencés dans les tableaux ci-dessous. Les différents amplicons obtenus ont été séquencés grâce à la méthode Sanger (GATC, Cologne, Germany).

**Tableau 2** : Réactifs utilisés pour un mélange réactionnel pour les isolats du Ghana

Réactifs nécessaires pour les PCR DHFR et DHPS		
	PCR1	Nested PCR
Promega	Concentration finale	Concentration finale
MgCL2 (mM)	3	3
Buffer	1X	1X
dNTP (mM)	0,2	0,2
primer F (uM)	0,2	0,4
primer R (uM)	0,2	0,4
Taq (U/uL)	0,025	0,025
H2O		
DNA	2	1

**Tableau 3** : Amorces utilisées lors du génotypage *pfdhfr* et *pfdhps* pour les isolats du Ghana

	DHFR	DHPS
<b>Amorces PCR1</b>	AMP1F: TTTATATTTTCTCCTTTTTA AMP2R: AGAAAACGAATAATAAAATG	DHPS_F1 AACCTAAACGTGCTTCAA DHPS_R2 TTGTGGACAAATCACACAATT
<b>Amorces Nested PCR</b>	AMP3F: TGATGGAACAAGTCTGCGAC AMP2R: AGAAAACGAATAATAAAATG	DHPS_F3 ATGATAAATGAAGGTGCTAG DHPS_R4 ACATGATGAACAACAAAATGA
<b>Amorce de Sequençage I</b>	AMP4R: CCAGAAATAAATGAAAATGA	<b>Amorce de Sequençage DHPS</b> DHPS-R4 OR DHPS_R5: TTTCTTGTATTAAATGGAATACCTCG

**Tableau 4** : Conditions utilisées pour l'amplification *pfdhfr* et *pfdhps* pour les isolats du Ghana

Conditions d'amplification pour la PCR1 DHFR	Conditions d'amplification pour la PCR1 DHPS
94°C pendant 3 min	94°C pendant 3 min
45 X (94°C pendant 30 sec; 45°C pendant 30 sec; 65°C pendant 45 sec)	40 X (94°C pendant 30 sec; 50°C pendant 30 sec; 65°C pendant 45 sec)
65°C pendant 10 min	65°C pendant 10 min
15°C à l'infini	15°C à l'infini
<b>Conditions d'amplification pour la nested_PCR DHFR</b>	<b>Conditions d'amplification pour la nested_PCR DHPS</b>
94°C pendant 3 min	94°C pendant 3 min
35 X (94°C pendant 30 sec; 50°C pendant 30 sec; 65°C pendant 45 sec)	35 X (94°C pendant 30 sec; 52°C pendant 30 sec; 65°C pendant 45 sec)
65°C pendant 5 min	65°C pendant 5 min
15°C à l'infini	15°C à l'infini

Après séquençage, du gène *pfdhfr*, les codons en position 51, 59, 108 et 164 ont été analysés. Les mutations N51I, C59R, S108N et I164L au niveau du polypeptide PfDHFR sont des déterminants génétiques de la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine.

Quant au gène *dhps*, les codons en position 436, 437, 540, 581 et 613 ont été également analysés. Les mutations S436A/F, A437G, K540E, A581G et A613S/T au niveau du polypeptide PfDHPS sont des déterminants génétiques de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine.

### **3.1.1.3. Résultats**

Un article vient valoriser les travaux de thèse menés sur le projet MAHEVA. L'article 1 ci-dessous a été soumis à Malaria Journal et présente de façon détaillée l'ensemble des résultats obtenus.

**ARTICLE 1: Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine improves pregnancy outcome in rural Ghana despite the gradual increase in resistance to this drug combination.**

**Objectifs de l'étude:**

Cette étude vise en premier lieu, à évaluer l'impact du respect de l'utilisation de la nouvelle politique du TPI-SP sur le poids de naissance des nouveau-nés dans deux zones rurale et semi-rurale de la région Volta du Ghana ; ensuite à déterminer l'impact de la prise d'un nombre de dose de TPI-SP supérieur ou égale à trois doses sur les parasites portant une mutation associée à la résistance à la SP.

**Résultats clés :**

La prévalence du paludisme était très élevée chez les femmes recrutées au cours de leur première consultation prénatale comparée à celles recrutées à l'accouchement. A l'accouchement, plus de la moitié des femmes recrutées (66%) avaient pris plus de trois doses de TPI-SP, et ce, que ce soit dans la zone rurale de Adidome ou celle semi rurale de Battor. A l'accouchement, la prise d'au moins trois doses de TPI-SP sur les deux sites d'étude a été associée à une augmentation du poids de naissance des nouveaux nés.

Afin d'évaluer l'impact de la nouvelle politique d'utilisation du TPI-SP sur la sélection des parasites résistants, nous avons génotypé une sous-population de parasites collectés chez des femmes à l'accouchement et nous avons identifié les parasites résistants. Une analyse de cette sous-population parasitaire à l'accouchement a montré que le nombre de parasites portant la mutation A581G associée à la SP était plus élevé chez les femmes ayant pris un nombre de doses supérieur ou égal à trois plutôt que chez les femmes ayant pris moins de doses.

# Malaria Journal

## Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine improves pregnancy outcome in rural Ghana despite the gradual increase in resistance to this drug combination.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MALJ-D-21-00378	
<b>Full Title:</b>	Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine improves pregnancy outcome in rural Ghana despite the gradual increase in resistance to this drug combination.	
<b>Article Type:</b>	Research	
<b>Funding Information:</b>	research institute for developpement	Mrs Atikatou MAMA
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background :</b> Despite constantly renewed prevention efforts, the burden of malaria in pregnancy (MIP) remains a great public health concern. Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) used as intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp-SP) is an important component of the malaria prevention strategy implemented in Africa. However, IPTp-SP is under constant threat from parasite resistance, thus requires regular evaluation to inform decision-making bodies.</p> <p><b>Methods :</b> In two endemic communities in the Volta region (Adidome and Battor), a cross-sectional hospital-based study was conducted in pregnant women recruited at their first antenatal care (ANC) visit and at delivery. Basic clinical and demographic information were documented and their antenatal records were consulted to confirm TPTp-SP adherence. Peripheral and placental blood were assayed for the presence of Plasmodium falciparum parasites by qPCR. One hundred and twenty (120) positive samples were genotyped for mutations associated with SP resistance.</p> <p><b>Results:</b> At first ANC visit, P. falciparum prevalence was 28.8% in Adidome and 18.2% in Battor. This decreased to 14.2% and 8.2% respectively at delivery. At delivery, 66.2% of the women had taken at least the recommended 3 or more doses of IPTp-SP and there was no difference between the two communities. Taken at least 3 IPTp-SP doses was associated with an average birth weight of more than 360g at both study sites compared to women who did not take treatment (p=0.0028). The Pfdhfr/Pfdhps quintuple mutant IRN I- A/FG KAA was the most prevalent (46.7%) haplotype found and the nonsynonymous Pfdhps mutation at codon A581G was higher at delivery among post-SP treatment isolates (37.5%) compared to those of first ANC (11.4%). There was also an increase in the A581G mutation in isolates from women who 3 or more IPTp-SP (p=0.036517).</p> <p><b>Conclusions :</b> This study confirms a positive impact following the implementation of the new IPTp-SP policy in Ghana in increasing the birth weight of newborns. However, the selection pressure exerted by the recommended 3 or more doses of IPTp-SP results in the emergence of parasites carrying the nonsynonymous mutation on codon A581G. This constant selective pressure calls into question the time remaining for the clinical utility of IPTp-SP treatment during pregnancy in Africa.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	Atikatou MAMA, M.Sc NMIMR: University of Ghana Noguchi Memorial Institute for Medical Research Accra, GHANA	
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	matika1be@yahoo.fr	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	NMIMR: University of Ghana Noguchi Memorial Institute for Medical Research	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Atikatou MAMA, M.Sc	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Atikatou MAMA, M.Sc	

	Charity Ahiabor
	Bernard Tornyigah, PhD
	Naa Adjeley Frempong
	Kwadwo Asamoah Kusi
	Bright Adu
	Sandrine Houze
	Philippe Deloron
	Michael F. Ofori
	Abraham Kwabena Anang
	Frédéric Arieu
	Nicaise Tuikue NDAM
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Is this study a clinical trial?</b><hr><i>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>	No
Are you submitting to a Thematic Series?	No

[Click here to view linked References](#)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine improves pregnancy outcome in rural Ghana despite the gradual increase in resistance to this drug combination.**

Atikatou MAMA<sup>1,2,3</sup>, Charity Ahiabor<sup>2,5</sup>, Bernard Tornyigah<sup>4</sup>, Naa Adjeley Frempong<sup>2</sup>, Kwadwo A. Kusi<sup>4</sup>, Bright Adu<sup>4</sup>, Sandrine Houze<sup>1,6</sup>, Philippe Deloron<sup>1</sup>, Michael F. Ofori<sup>4</sup>, Abraham K. Anang<sup>2</sup>, Frédéric Arie<sup>3</sup>, Nicaise Tuikue Ndam<sup>1,2</sup>

1. Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France.
2. Department of Parasitology, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, College of Health Sciences, University of Ghana, Legon, Ghana.
3. Université de Paris, INSERM 1016, Service de Parasitologie-Mycologie Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France
4. Department of Immunology, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, College of Health Sciences, University of Ghana, Legon, Ghana.
5. Department of Science Laboratory Technology, Faculty of Applied Sciences, Accra Technical University, P O Box GP 561, Accra Ghana.
6. Centre National de Référence du Paludisme, Hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, F-75018 Paris, France.

‡ Correspondence and requests should be addressed to Atikatou MAMA or Nicaise NDAM (email: matika1be@yahoo.fr ; nicaise.ndam@ird.fr)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

**Background:** Despite constantly renewed prevention efforts, the burden of malaria in pregnancy (MiP) remains a great public health concern. Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP), used as intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp-SP) is an important component of the malaria prevention strategy implemented in Africa. However, IPTp-SP is under constant threat from parasite resistance, thus requires regular evaluation to inform decision-making bodies.

**Methods:** In two malaria endemic communities in the Volta region (Adidome and Battor), a cross-sectional hospital-based study was conducted in pregnant women recruited at their first antenatal care (ANC) visit and at delivery. Basic clinical and demographic information were documented and their antenatal records were consulted to confirm IPTp-SP adherence. Peripheral and placental blood were assayed for the presence of *Plasmodium falciparum* parasites by qPCR. One hundred and twenty (120) positive samples were genotyped for mutations associated with SP resistance.

**Results:** At first ANC visit, *P. falciparum* prevalence was 28.8% in Adidome and 18.2% in Battor. This decreased to 14.2% and 8.2% respectively at delivery. At delivery, 66.2% of the women had taken at least the recommended 3 or more doses of IPTp-SP and there was no difference between the two communities. Taking at least 3 IPTp-SP doses was associated with an average birth weight increase of more than 360g at both study sites compared to women who did not take treatment (p=0.0028). The *Pfdhfr/Pfdhps* quintuple mutant **IRNI-A/FGKAA** was the most prevalent (46.7%) haplotype found and the nonsynonymous *Pfdhps* mutation at codon A581G was higher at delivery among post-SP treatment isolates (37.5%) compared to those of first ANC (11.4%). There was also an increase in the A581G mutation in isolates from women who took 3 or more IPTp-SP (p=0.036517).

**Conclusions:** This study confirms a positive impact following the implementation of the new IPTp-SP policy in Ghana in increasing the birth weight of newborns. However, the selection pressure exerted by the recommended 3 or more doses of IPTp-SP results in the emergence of parasites carrying the non-synonymous mutation on codon A581G. This constant selective pressure calls into question the time remaining for the clinical utility of IPTp-SP treatment during pregnancy in Africa.

**Keywords:** Malaria, Pregnancy, *Plasmodium falciparum*, Ghana, IPTp-SP, SP resistance.

1  
2  
3B **Introduction**  
4  
5

5B In Sub-Saharan Africa where malaria is still endemic, pregnant women commonly suffer from malaria in pregnancy (MiP)  
7  
5B resulting in low birth weight (LBW), maternal anemia, and increased risk of infant mortality during the first years of life.  
9

10 The pathophysiology of MiP is associated with the ability of *Plasmodium falciparum*, the specie accounting for more than  
11  
12 90% of the world's malaria mortality, to sequester in the intervillous spaces of the placenta through interaction with the  
13  
14 parasite ligand VAR2CSA<sup>1-5</sup>. To reduce the burden of MiP on pregnant women in Sub-Saharan Africa, the World Health  
15  
16 Organization (WHO) recommended a set of measures including the preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine  
17  
18 (SP) of all pregnant women from the second trimester of pregnancy<sup>6-9</sup>. Although the adaptation and use of intermittent  
19  
20 preventive treatment of malaria in pregnancy (IPTp) had been shown to be effective in averting LBW across different SP-  
21  
22 resistant settings<sup>10,11</sup>, this treatment has often fallen short of WHO's expectations. Several studies showed that the two-dose  
23  
24 regimen initially recommended was inadequate in protecting neonates from the deleterious effect of MiP during the third  
25  
26 trimester<sup>12-14</sup>. This in conjunction with other observations, including a dose-dependent beneficial effect of IPTp-SP on birth  
27  
28 weight, and the unavailability of an alternative to SP that may have similar advantages on birth weight, WHO revised its  
29  
30 policy and recommended a monthly uptake of IPTp-SP from the second trimester of pregnancy<sup>12</sup>. However, concern is  
31  
32 growing because an increase in SP uptake is not without consequences on the emergence of drug-resistant malaria parasites.  
33  
34 This has a particular resonance in Sub-Saharan Africa, where there is already a noticeable increase and spread of resistance  
35  
36 to SP and to date, no other alternative drug with the same benefits as SP has been identified.  
37  
38

39 Like most Sub-Saharan countries, Ghana adopted and intensified the implementation of the revised WHO policy in 2013,  
40  
41 with pregnant women taking a higher number of IPTp-SP doses starting from the second trimester of pregnancy. It also  
42  
43 required regular evaluation to preserve the intended benefit of the policy change. In Ghana, a study carried out two years  
44  
45 after the revised policy implementation by Quakyi and colleagues in urban and peri-urban areas showed that increased birth  
46  
47 weight correlated with an increase in the number of IPTp-SP doses taken<sup>5</sup>. Another study in rural Northern Ghana  
48  
49 demonstrated an association between increased IPTp-SP dosage ( $\geq 3$ ) and improved term delivery<sup>8</sup>. However, the majority  
50  
51 of these investigations were carried out in urban communities where malaria infection is low and resources are abundant. In  
52  
53 the present study, we recruited pregnant women in two malaria endemic rural and semi-urban areas in the Volta region of  
54  
55 Ghana in order to assess IPTp-SP coverage, SP resistance, and its consequences on health of both mothers and their  
56  
57 newborn infants.  
58  
59

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Materials and Methods

### Study sites

The study was conducted from November 2016 to March 2019 in two distinct malaria endemic communities of the Volta region of Ghana: Battor, a semi-urban community and the administrative capital of the North Tongu District, situated 6° 4' 0" North, 0° 25' 0" East. The primary health care service in the district is mainly provided by the Battor Catholic Hospital with the support of local Community-based Health Planning and Services (CHIPS) compounds. Adidome is a rural community 50 km East of Battor and is the administrative center for the Central Tongu District. Primary health care is provided by the district hospital located in Adidome and also supported by a number of CHIPS compounds. Like most parts of southern Ghana, malaria transmission in these areas is perennial with two peaks of transmission during rainy seasons. The entomological inoculation rate (EIR) for the Volta region was approximately 65 (95% CI: 0 - 143) infectious bites per person per year in 2008<sup>9</sup> and the main vector is *Anopheles gambiae*.

### Study design and sample collection

The study was designed as a cross-sectional hospital-based survey to recruit 1,000 pregnant women at their first antenatal care visit (ANC); comprising of 500 from each study site and these women were to be passively followed until delivery. In one of the surveys, pregnant women were recruited during their first antenatal consultation (ANC) between November 2016 and March 2019. At the same time, another survey targeted delivering women at the maternity wards. Standardized questionnaires and checklists were used to collect demographic and clinical data both at ANC and delivery. Information on IPTp-SP doses received during antenatal visit were documented. Peripheral blood was collected into an EDTA tube, as well as blood spots on filter paper before administration of IPTp-SP. Haemoglobin (Hb) levels were determined at the hospital laboratory, and results recorded in participant's booklets and ANC records books.

At delivery, IPTp-SP dose uptake number, parity status and complementary clinical data such as the number of ANC visits, type of complication during pregnancy, type of delivery, Hb level and weight at birth were obtained from participants' ANC booklets. Peripheral and placental blood from each participant was also collected into separate EDTA vacutainer tubes, blood spots were made and the mother's peripheral blood Hb level measured at the hospital's laboratory.

At both time points, parasites were detected using either microscopy, and rapid diagnostic test (RDT) when available. All blood samples were processed and stored appropriately for further analysis.

1  
2  
3 **DNA extraction and parasite detection by PCR**

4  
5  
6 DNA was extracted from the blood spots on filter paper using the Chelex method<sup>15</sup>. The presence of *P. falciparum* DNA in  
7  
8 the extracted DNA was examined in duplicate by qPCR amplifying 18S rRNA, as previously described<sup>16</sup>. Samples without  
9  
10 amplicons (no cycle thresholds detected) were considered negative. Purified parasite DNA from the 3D7 strain was used as  
11  
12 a positive control, while a negative control with no DNA template was run in parallel.

13  
14 **Genotyping of *Pfdhfr* and *Pfdhps***

15  
16  
17 The *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes of *P. falciparum* were amplified as previously described<sup>17</sup>. The PCR products were purified  
18  
19 and sequenced using the Sanger method (GATC, Cologne, Germany). All generated sequences were analysed with the  
20  
21 Chromas software<sup>18</sup>, then aligned using Muscle<sup>19</sup> and compared to the 3D7 *P. falciparum* reference genome.

22  
23 **Statistical analysis**

24  
25  
26 Women recruited during ANC were included if they had not yet attended an antenatal consultation for this pregnancy and if  
27  
28 they had essential information such as age, parity, maternal haemoglobin levels, as well as malaria qPCR results on the  
29  
30 peripheral blood at the time of inclusion. At delivery, pregnant women were included in the analysis if in addition to the  
31  
32 above-mentioned criteria; they had all necessary information on IPTp uptake, as well as malaria qPCR results for both  
33  
34 peripheral and placental blood at the time of delivery. Women were grouped into three categories based on their IPTp-SP  
35  
36 uptake; women who did not receive any IPTp-SP, women who received one or two IPTp-SP doses, and women who  
37  
38 received 3 or more IPTp-SP doses. To analyse the genotyping results of *Pfdhfr* and *Pfdhps*, women were also classified in  
39  
40 two groups; women who received 3 or more IPTp-SP doses and those who received less than 3 IPTp-SP doses. Participant's  
41  
42 baseline characteristics and *Pfdhps* mutations were compared between groups by Student's t test. Parasitological outcomes  
43  
44 were compared between groups by univariate analysis and logistic or linear regression models. Changes in maternal  
45  
46 haemoglobin levels and birthweight with increases in IPTp-SP uptake were assessed by linear regression. The modification  
47  
48 of the associations by study area was assessed. P values of less than 0.05 were considered as statistically significant. Stata  
49  
50 version 13 was used for data analysis and GraphPad version 5.01 for graphical depiction of data.

51  
52 **Results**

53  
54 **Study population characteristics**

55  
56  
57 A total of 932 pregnant women were recruited at the first ANC and 617 women at delivery. At the end, 692 women out of  
58  
59 932 (366 from Adidome and 326 from Battor) were included in the analysis for ANC versus 499 (284 in Adidome and 215

1  
2  
3 in Battor) for women recruited at delivery. The characteristics of the participants were similar between the two study sites,  
4  
5 except for age ( $p = 0.003$ ), gestational age ( $p < 0.0001$ ), and Hb level ( $p = 0.004$ ) at ANC (**Table 1**). Pregnant women  
6  
7 recruited at first ANC at Adidome were generally younger and had a lower gestational age at the time of their first antenatal  
8  
9 care visits (Age =  $25.81 \pm 6.39$ ; Gestational age =  $13.93 \pm 7.05$ ) compared to those recruited at Battor (Age =  $27.44 \pm 6.01$ ;  
10  
11 Gestational age =  $16.53 \pm 8.20$ ). Pregnant women from Battor had higher haemoglobin levels ( $11.36 \pm 1.15$ ) compared to  
12  
13 those from Adidome ( $10.61 \pm 1.44$ ).

### 14 15 ***P. falciparum* prevalence**

16  
17  
18 Of the women who attended their first ANC, only 77.3% (297/384) at Adidome and 81.9% (267/326) at Battor had  
19  
20 microscopy data, because the results of some blood smears were considered uncertain due to poor quality and therefore  
21  
22 excluded. For the women retained, *P. falciparum* prevalence detected by microscopy at Adidome and Battor was 12.5%  
23  
24 (37/297) and 6.4% (17/267), respectively. When assessed by qPCR, the prevalence increased to 28.4% (104/366) and 18.1%  
25  
26 (59/326) in Adidome and Battor, respectively.

27  
28  
29 At delivery, *P. falciparum* prevalence by microscopy was 0.7% (2/284) and 0% (0/215), respectively, and was 14.1%  
30  
31 (40/284) and 7.9% (17/215) at Adidome and Battor when detected by qPCR. *P. falciparum* prevalence in placental samples  
32  
33 determined by qPCR at delivery was 16.5% (47/284) at Adidome against 3.3% (7/215) at Battor (**Table 2**).

### 34 35 **IPTp-SP coverage**

36  
37  
38 Since IPTp-SP was given under direct observation therapy (DOT), information on uptake by pregnant women at delivery  
39  
40 was obtained from their antenatal booklets as a source of IPTp-SP uptake. Among the 499 pregnant women recruited at  
41  
42 delivery, 94.8% (473/499) had data on IPTp-SP uptake. Among these, 97 % (459/473) took at least one dose of IPTp,  
43  
44 66.2% (313/473) took 3 or more IPTp-SP doses, while 31 % (146/473) took one or two doses. Fourteen pregnant women  
45  
46 reported no IPTp-SP uptake due to non-attendance at an ANC.

47  
48  
49 When the data were stratified by study site, at Adidome 283 of the 284 women recruited had data on IPTp-SP uptake. One  
50  
51 hundred and eighty-five women (65.4%) received 3 or more IPTp-SP doses, 18.7% (53/283) received two IPTp-SP doses  
52  
53 and 12.4% (35/283) received one IPTp-SP dose. Ten women reported no IPTp-SP uptake due to non-attendance at ANC  
54  
55 visit. At Battor, 88.4% (190/215) of pregnant women recruited at delivery had information on IPTp-SP uptake. Out of this  
56  
57 number, 67.4 % (128/190) received 3 or more IPTp-SP doses, 16.8% (32/190) received two IPTp-SP doses and 13.7%  
58  
59 (26/190) received only one IPTp-SP dose. Four women reported no IPTp-SP due to non-attendance at ANC (**Figure 1**).

## Impact of IPTp-SP uptake on birth weight

Overall multivariate regression analysis showed that uptake of 3 or more IPTp-SP doses increased the average birthweight by 360g compared to babies born to mothers who did not take treatment ( $p = 0.03$ ). Although an increase in birthweight of 250g was also observed among infants born to women who took only 1 or 2 IPTp-SP doses, this was not statistically significant ( $p = 0.14$ ). As expected, children born to primigravid mothers weighed on average 250g less than those born to multigravidae ( $p < 0.0001$ ) (Table 3).

## Prevalence of *Pfdhfr* and *Pfdhps* mutations

A total of 120 *P. falciparum* isolates were sequenced, of which, 73.3% (88/120) were from pregnant women recruited at ANC (58 % from Adidome and 42. % from Battor) and 26.7% (32/120) from pregnant women recruited at Delivery (31.3% from Battor and 68.7% from Adidome). Of the 120 isolates sequenced, 93.3% (112/120) were successfully amplified, sequenced and genotyped for *Pfdhfr* and 87.5% (105/120) for *Pfdhps*.

A high prevalence of nonsynonymous mutations of three codons of *Pfdhfr* and two codons of *Pfdhps* was detected among the parasite isolates. Regarding *Pfdhfr*, the prevalence of a mutant allele at codon 108 (S108N, 98.2%, 110/112) was predominant; followed by that of codon 59 (C59R, 97.3%, 109/112) and 51 (N51I, 89.3%, 100/112). However, only one mutation was observed at codon 164 (I164L, 0.9%, 1/112). Similarly, a high prevalence of a mutation at codon 437 (A437G, 97.1% (102/105) of the *Pfdhps* gene was observed followed by that of 436 (S436A/F, 72.4%, 76/105). Additionally, mutations were observed respectively at codons 581 (A581G, 21%, 22/105) and 613 (A613S/T, 4.8%, 5/105), . However, no mutation was detected at codon 540 (**Table 4**). We subsequently focused on the nonsynonymous mutation A581G and showed that mutant alleles (A581G) were preferentially found at delivery following IPTp-SP treatment (37.5%), compared to inclusion (11.4%) (ratio of first ANC/delivery 1:3.2;  $p = 0,001$ ) (**Table 5**). By separating infected women according to their IPTp-SP uptake it appeared that taking  $\geq 3$  IPTp-SP doses was associated with an increase in the prevalence of the nonsynonymous A581G mutation at delivery ( $p=0.04$ ).

When the *Pfdhfr/Pfdhps* haplotypes were combined for the 105 parasites for whom sequence data was obtained; 16 haplotypes were observed (**Table 6**). Isolates with quintuple mutations including triple *Pfdhfr* **IRNI** and double *Pfhps* **A/FGKAA** was the most common combined trait seen at a rate of 46.7% (49/105), followed by the quadruple combined trait (**IRNI-SGKAA**) at 16.2% (17/105). The occurrence of other combined genotypes was generally low and comprised between 1% and 8%.

1  
2  
188 **Discussion**  
4  
5

189 The SP drug, currently used as intermittent preventive treatment during pregnancy (IPTp-SP), remains a fundamental  
190 component in the strategy to protect pregnant women from malaria and its adverse effects on pregnancy outcome. Yet, its  
191 adaptation and utilization had been unexpectedly sub-optimal, while several studies showed its inability to provide  
192 protection from malaria, especially in the third trimester<sup>20</sup>. Combined, this prompted a policy review to increase its  
193 utilization and coverage throughout the pregnancy period, and since revision of this policy by the WHO, many countries  
194 including Ghana are working for its successful implementation. The initial and few evaluation studies indicate that the new  
195 treatment regimen is associated with a real clinical benefit on the outcome of pregnancy<sup>5,8</sup>. However, such studies need to  
196 be repeated on a regular basis to monitor the preservation of this added value, as it could over time, lead to other suspected  
197 consequences on parasite resistance that could mitigate clinical benefit. The policy of increasing treatment doses certainly  
198 applies an increased drug-selection pressure on parasites and therefore, it must be regularly assessed to inform decision  
199 makers.  
200

201 Here, we enrolled two different sets of pregnant women living in rural areas on the banks of the Volta river in Ghana: those  
202 visiting health centers for their first ANC and the second set coming to deliver the babies at health centers. The design of  
203 our study makes it possible to capture the characteristics of women appearing at their first ANC and to determine their usage  
204 of IPTp-SP, as part of the strategy for malaria prevention during pregnancy in the delivery cohort. The first observation is  
205 early attendance of ANC, women arriving on average between 14th and 16th week of pregnancy. This early attendance to an  
206 ANC is a determining factor for the successful implementation of the new IPTp-SP policy. Indeed, it is essential that women  
207 arrive early at an ANC to offer more time to receive a maximum of treatment doses over a longer period of pregnancy<sup>21</sup>.  
208 This observation in rural areas is particularly important, because it's similar to that made in urban areas in a previous study  
209 by our group<sup>5</sup> and clearly indicates that sensitization of women in Ghana for their early participation in ANCs has been  
210 relayed across the country. This is in particular due to the National Malaria Control Programme's (NMCP) efforts in  
211 promoting awareness combined with improved education of the risk to pregnant women at ANC. Data from this study  
212 shows that 66 % of participants received three or more IPTp-SP doses. This finding is also consistent with previous  
213 investigations in other parts of Ghana reporting that more than 60% of pregnant women took at least three IPTp-SP  
214 doses<sup>5,22</sup>. It's interesting to note that the fairly satisfactory coverage of IPTp-SP in Ghana does not seem to differ  
215 significantly among community settings across the country. The study shows that a small number of women (N=14)  
216 nevertheless reported not taking IPTp-SP during pregnancy due to not attending ANC. This confirms the importance of  
217 ANC attendance in IPTp-SP coverage, especially since it is administered in Ghana only as a direct observation therapy  
218

1  
2  
3 (DOT). It therefore appears legitimate to further consider the involvement of communities in the delivery of IPTp-SP to all  
4  
5 eligible pregnant women, as this would help reduce the number of women not taking IPTp-SP due to their non-attendance at  
6  
7 an ANC.

8  
9  
10 In our study, we observed a beneficial effect of IPTp-SP on birth weight. In this instance, uptake of  $\geq 3$  SP doses was clearly  
11  
12 associated with an increase in birth weight at our two study sites by 360g (Table 3). The association of more IPTp-SP doses  
13  
14 with increased birthweight was obvious in both primigravid and multigravid women and consistent with a study by Desai et  
15  
16 al (2016) and Quakyi et al (2019) that reported reduced risk of LBW among pregnant women living in medium-high SP  
17  
18 resistant areas. In this study, we did not observe any association between IPTp-SP dosage and parasite density or placental  
19  
20 infection at delivery, as observed in other studies (reviewed by Kayentao et al. (2013); Mporogo et al, (2014)). As  
21  
22 discussed previously by Quakyi et al (2019), the lack of an observable link in this non-longitudinal study is not surprising  
23  
24 and does not necessarily reflect any lack of effect on parasites. It's still plausible that the effect of SP treatment on other  
25  
26 non-malarial infections (especially sexually transmitted infections) indirectly contributes to this observed beneficial effect  
27  
28 on birth weight. Also, an association was not found between uptake of  $\geq 3$  SP doses and anaemia confirming the finding of  
29  
30 Agyeman et al (2021): IPTp-SP alone doesn't protect pregnant women from anaemia, because anaemia in pregnancy is  
31  
32 multifactorial and involves other factors such as nutrition.

33  
34  
35 On the other hand, our study shows a high prevalence of *Pfdhfr/Pfdhps* quintuple mutations in parasite isolates from both  
36  
37 study sites, but unlike what is happening in East Africa, no *Pfdhps* K540E mutation was found<sup>23</sup>. This result indicates that  
38  
39 *Pfdhps* K540E mutation conferring a high level of resistance to SP has not yet emerged at our study sites, although it has  
40  
41 been detected at very low frequency at different communities in southern Ghana (Tornyigah et al, 2020).

42  
43  
44 Between first ANC and delivery, the prevalence of the A581G *Pfdhps* mutation increased approximately 3.2-fold in our  
45  
46 study population, suggesting that IPTp-SP use may possibly select the *Pfdhps* A581G mutation. This observation is further  
47  
48 supported by the fact that the prevalence of *Pfdhps* A581G mutation increased with the number of SP doses taken, as also  
49  
50 described by Tornyigah et al in 2020. The correlation of this mutation with IPTp-SP treatment is consistent with selection  
51  
52 due to drug pressure. It has been shown that *Pfdhps* A581G mutation occurring on a *Pfdhfr/Pfdhps* quintuple mutation  
53  
54 background was associated with higher risks of infection in Malawian pregnant women<sup>24</sup>. At our study site, no correlation  
55  
56 was found between parasite density and the frequency of the *Pfdhps* A581G mutation. However, the increase in the  
57  
58 prevalence of *Pfdhps* A581G mutation at delivery and the emergence of the sextuple mutation (IRNI-A/FGKGS/T) raises

1  
2  
244 the question of whether a possible increase in the prevalence of parasites carrying the sextuple mutation could gradually  
4  
245 lead to IPTp-SP drug failure in Ghana.  
6

7  
246 The parasite SP resistance background did not affect birth weight outcomes: IPTp-SP was associated with a similar increase  
9  
247 in birthweight at different communities in southern Ghana irrespective of SP resistance<sup>5</sup>. This finding may be due to  
11  
248 secondary non-malaria related effects (bacterial or fungal genital infections for instance), that also impact on fetal growth  
13  
249 and maternal health<sup>25</sup>. We propose that an effect of SP on birth weight independent of malaria infection needs to be  
15  
250 examined.  
17

18  
251 Despite the high prevalence of *Pfdhfr/Pfdhps* quintuple mutations and even the existence of sextuple mutations, IPTp-SP  
20  
252 continues to prove its beneficial effect on birth weight at delivery in Ghanaian pregnant women.  
22

## 23 253 **Conclusion** 24

254 The NMCP target is to treat all pregnant women with IPTp-SP even though this will undoubtedly lead to a drastic increase  
26  
255 of SP-induced drug pressure on parasite populations. Thus, an increase in A581G mutation prevalence and/or emergence of  
28  
256 the K540E mutation must be carefully documented to assure long-term IPTp-SP efficacy and performed in parallel with  
30  
257 implementation of field studies on alternatives to IPTp-SP such as other antimalarial drug combinations or a malaria vaccine  
32  
258 for pregnant women.  
34

## 35 259 **List of abbreviations** 37

38  
260 **ANC:** antenatal care visit or Antenatal care consultation  
40

41  
261 **CHIPS:** Community-based Health Planning and Services  
43

44  
262 **DOT:** Direct observation therapy  
46

47  
263 **EIR:** Entomological inoculation rate  
48

49  
264 **Hb:** Haemoglobin  
51

52  
265 **IPTp:** Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy  
54

55  
266 **LBW:** Low birth weight  
57

58  
267 **MiP:** Malaria in pregnancy  
59

60  
268 **NMCP:** National Malaria Control Programme  
62

1  
2  
269 **NMIMR:** Noguchi Memorial Institute for Medical Research

4  
5  
270 ***P. falciparum*** : *Plasmodium falciparum*

7  
8  
271 **RDT:** Rapid diagnostic test

10  
272 **SP:** Sulfadoxine-pyrimethamine

12  
13  
273 **WHO:** World Health Organization

15  
16  
274 **Declarations**

18  
19  
275 **Ethics approval and consent to participate**

20  
21  
276 Ethical clearance was obtained from the Institutional Review Board of the Noguchi Memorial Institute for Medical  
23  
274 Research (NMIMR) and from the Ethical Review Committee of the Ghana Health Service. Written informed consent was  
25  
278 obtained from each participant or their guardians for those under 18 years prior to recruitment into the study.

28  
279 **Consent for publication**

30  
31  
280 Not applicable

33  
34  
281 **Availability of data and materials**

35  
36  
282 The datasets analysed for this study are included in the article, additional data required are available from the corresponding  
38  
283 author on reasonable request.

40  
41  
284 **Competing interests**

43  
44  
285 The authors declare that they have no competing interests.

46  
47  
286 **Funding**

48  
49  
50 This study was supported by the French Institute for Sustainable Development (IRD) under the call for the creation of the  
51  
52 young team associated with the IRD (JEA-MAHEVA), and of the international joint laboratory (LMI-CONSHELM). A.M.  
53  
287 was supported by Labex ParaFrap South Ph.D. fellowship. The project was funded by IRD.  
55

1  
2  
293  
4  
5  
291  
6  
7  
292  
8  
9  
293  
10  
11  
294  
12  
13  
14  
295  
15  
16  
297  
18  
299  
20  
298  
22  
299  
24  
25  
300  
27  
28  
301  
30  
31  
302  
32  
33  
304  
35  
36  
304  
38  
39  
305  
40  
41  
42  
306  
43  
44  
307  
46  
47  
308  
49  
50  
309  
51  
52  
53  
310  
54  
55  
316  
57  
58  
312  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Author’s contributions**

N.T.N., A.K.A., M.F.O. and K.A.K contributed to the design of the MAHEVA study; A.M., C.A., N.A.F. and B.T. collected the samples and carried out all the lab experiments, A.M., B.T., N.T.N. and A.F. performed the sequence analysis and statistical analysis. A.M., A.F., and N.T.N. wrote the paper. B.T., B.A, S.H., K.A.K, F.A. and N.T.N. reviewed the manuscript.

**Acknowledgements**

We are grateful to all the women who participated in the study. We thank the staff of the study sites (Battor Catholic Hospital and Adidome district Hospital) for their contribution to participant enrollment and samples collection. Special thanks to Prof. Gordon Langsley for helping to edit this manuscript, to Renosten Tetteh and Tatiana Hountohotegbe for their help in the laboratory.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

1. Doritchamou, J. Y. A. *et al.* Placental malaria vaccine candidate antigen VAR2CSA displays atypical domain architecture in some *Plasmodium falciparum* strains. *Communications Biology* **2**, 1–9 (2019).
2. WHO | Intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp). *WHO* [http://www.who.int/malaria/areas/preventive\\_therapies/pregnancy/en/](http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/en/) (2019).
3. Opong, F. B. *et al.* Intermittent preventive treatment of pregnant women in Kintampo area of Ghana with sulphadoxine-pyrimethamine (SP): trends spanning 2011 and 2015. *BMJ Open* **9**, (2019).
4. Eisele, T. P. *et al.* Malaria prevention in pregnancy, birthweight, and neonatal mortality: a meta-analysis of 32 national cross-sectional datasets in Africa. *The Lancet Infectious Diseases* **12**, 942–949 (2012).
5. Quakyi, I. *et al.* High uptake of Intermittent Preventive Treatment of malaria in pregnancy is associated with improved birth weight among pregnant women in Ghana. *Scientific Reports* **9**, 19034 (2019).
6. K, K. *et al.* Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **309**, 594–604 (2013).
7. Owusu-Boateng, I. & Anto, F. Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a cross-sectional survey to assess uptake of the new sulfadoxine–pyrimethamine five dose policy in Ghana. *Malar J* **16**, 323 (2017).
8. Anto, F., Agongo, I. H., Asoala, V., Awini, E. & Oduro, A. R. Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy: Assessment of the Sulfadoxine-Pyrimethamine Three-Dose Policy on Birth Outcomes in Rural Northern Ghana. *Journal of Tropical Medicine* <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2019/6712685/> (2019) doi:<https://doi.org/10.1155/2019/6712685>.
9. Kweku, M. *et al.* Effect of a Malaria Control Program on the Prevalence of Malaria, Fever and Anaemia in Children under Five Years in the Hohoe Municipality of Ghana: A Comparative Analysis of Cross-Sectional Surveys. *Advances in Infectious Diseases* **05**, 180–188 (2015).
10. Walker, P. G. T., Floyd, J., Kuile, F. ter & Cairns, M. Estimated impact on birth weight of scaling up intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy given sulphadoxine-pyrimethamine resistance in Africa: A mathematical model. *PLOS Medicine* **14**, e1002243 (2017).

1  
2  
340  
4  
345  
6  
347  
8  
349  
10  
344  
12  
345  
14  
346  
16  
347  
18  
348  
20  
349  
22  
350  
24  
351  
26  
352  
28  
353  
30  
354  
32  
355  
34  
356  
36  
357  
38  
358  
40  
359  
42  
360  
44  
361  
46  
362  
48  
363  
50  
364  
52  
365  
54  
366  
56  
367  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

11. Desai, M. *et al.* Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight. *Clinical Infectious Diseases* **62**, 323–333 (2016).
12. Kayentao, K. *et al.* Comparison of Intermittent Preventive Treatment with Chemoprophylaxis for the Prevention of Malaria during Pregnancy in Mali. *The Journal of Infectious Diseases* **191**, 109–116 (2005).
13. White, N. J. Intermittent Presumptive Treatment for Malaria. *PLOS Medicine* **2**, e3 (2005).
14. Maiga, O. M. *et al.* Superiority of 3 Over 2 Doses of Intermittent Preventive Treatment With Sulfadoxine-Pyrimethamine for the Prevention of Malaria During Pregnancy in Mali: A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases* **53**, 215–223 (2011).
15. Plowe, C. V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O. & Wellems, T. E. Pyrimethamine and Proguanil Resistance-Conferring Mutations in Plasmodium falciparum Dihydrofolate Reductase: Polymerase Chain Reaction Methods for Surveillance in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**, 565–568 (1995).
16. Taylor, S. M. *et al.* A Quality Control Program within a Clinical Trial Consortium for PCR Protocols To Detect Plasmodium Species. *Journal of Clinical Microbiology* **52**, 2144–2149 (2014).
17. Pearce, R. J., Drakeley, C., Chandramohan, D., Mosha, F. & Roper, C. Molecular Determination of Point Mutation Haplotypes in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of Plasmodium falciparum in Three Districts of Northern Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1347–1354 (2003).
18. Goodstadt, L. & Ponting, C. P. CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics* **17**, 845–846 (2001).
19. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792–1797 (2004).
20. Moussiliou, A. *et al.* High rates of parasite recrudescence following intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during pregnancy in Benin. *Malaria Journal* **12**, 195 (2013).
21. Odjidja, E., Kwanin, C. & Saha, M. Low Uptake of Intermittent Preventive Treatment in Ghana; An Examination of Health System Bottlenecks. *Health Systems and Policy Research* **4**, (2017).
22. Darteh, E. K. M., Buabeng, I. & Akuamoah-Boateng, C. Uptake of intermittent preventive treatment in pregnancy for malaria: further analysis of the 2016 Ghana Malaria Indicator Survey. *J Public Health (Berl.)* (2020) doi:10.1007/s10389-020-01206-1.

1  
2  
368  
4  
369  
6  
370  
8  
371  
10  
372  
12  
373  
14  
374  
16  
375  
18  
376  
20  
377  
22  
378  
24  
379  
26  
380  
28  
381  
30  
382  
32  
383  
34  
384  
36  
385  
38  
386  
40  
387  
42  
388  
44  
389  
46  
390  
48  
391  
50  
392  
52  
393  
54  
394  
56  
395  
58  
396  
60  
62  
63  
64  
65

23. Gutman, J. *et al.* The A581G Mutation in the Gene Encoding Plasmodium falciparum Dihydropteroate Synthetase Reduces the Effectiveness of Sulfadoxine-Pyrimethamine Preventive Therapy in Malawian Pregnant Women. *J Infect Dis* **211**, 1997–2005 (2015).

24. Lin, J. T. *et al.* Increased prevalence of dhfr and dhps mutants at delivery in Malawian pregnant women receiving intermittent preventive treatment for malaria. *Trop Med Int Health* **18**, 175–178 (2013).

25. Chico, R. M., Chaponda, E. B., Ariti, C. & Chandramohan, D. Sulfadoxine-Pyrimethamine Exhibits Dose-Response Protection Against Adverse Birth Outcomes Related to Malaria and Sexually Transmitted and Reproductive Tract Infections. *Clin Infect Dis* **64**, 1043–1051 (2017).

1  
2  
39  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
39  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 1:** General characteristics of the study population

Characteristics	1st ANC visit		p-value	Delivery		p-value
	Adidome (n=366)	Battor (n=326)		Adidome (n=284)	Battor (n=215)	
Age (Mean ± SD)	25.81 ± 6.39	27.44± 6.01	**	26.88±6.07	27.26±5.31	
Gravidity/Parity (n (%))						
Primigravidae	114 (31.06%)	90 (27.69%)		65 (23.13%)	52 (26.40%)	
Multigravidae	253 (68.94%)	235 (72.31%)		216 (76.87%)	145 (73.60%)	
Gestational age in weeks (Mean ± SD)	13.93± 7.05	16.53±8.20	***	38.75±1.78	38.98±1.74	
Bednet possession (n (%))						
Yes	338 (92.10%)	306 (94.74%)		257 (94.83%)	197 (95.63%)	
No	29 (7.90%)	17 (5.26%)		14 (5.17%)	9 (4.37%)	
Bednet usage (n (%))						
Always	238 (64.85%)	228 (70.59%)		162 (60.90%)	105 (50.97%)	
sometimes	104 (28.34%)	73.0(22.6%)		89 (33.46%)	80 (38.83%)	
Seldom	25 (6.81%)	22 (6.81%)		5 (1.88%)	12 (5.83%)	
Hb (Mean ± SD)	10.61±1.44	11.36±1.15	**	10.79±1.22	10.71±1.87	
Anaemia status (n (%))						
Severe anaemic (Hb <8.0g/dL)	14 (4.6%)	0 (0%)		8 (2.85%)	8 (5.88%)	
Anaemic (11.0 < Hb ≥ 8.0g/dL)	154 (50.66%)	14 (25 %)		135 (48.04%)	74 (54.41%)	
Birth Outcome (Mean ± SD)				3.14±0.52	3.05±0.58	
Low birth weight <2500g				21 (7.45%)	17 (9.82%)	

\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

1  
2  
399  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
400  
401  
22  
403  
23  
404  
24  
25  
405  
27  
406  
29  
407  
31  
408  
32  
409  
34  
410  
36  
411  
38  
412  
39  
413  
41  
414  
43  
415  
45  
416  
47  
417  
48  
418  
50  
419  
52  
420  
54  
421  
56  
422  
57  
423  
58  
59  
424  
61  
62  
63  
64  
65

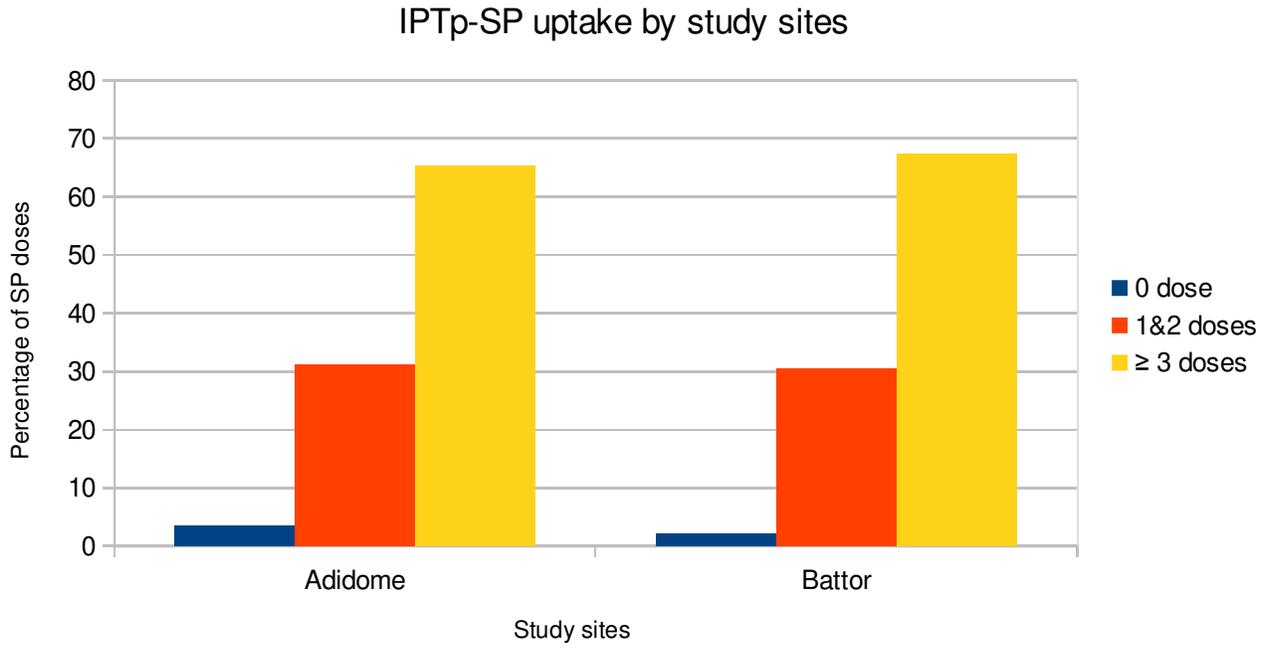
**Table 2:** *P. falciparum* prevalence at both study sites and at 1st ANC and Delivery

Characteristics	1st ANC		Delivery	
	Adidome (n = 366)	Battor (n = 326)	Adidome (n = 284)	Battor (n = 215)
<b>Peripheral infection*</b>				
By qPCR	104(28.4%)	59(18.1%)	40(14.1%)	17(7.9%)
<b>Parasite density#</b>				
By qPCR	5308 ± 85068	693 ± 6332	11566 ± 66809	4669 ± 34805
<b>Placental infection</b>				
By qPCR			47(16.5%)	7(3.3%)

\*n (%); #Mean ± SD;

1  
2  
425  
426  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
427  
428  
30  
31  
429  
32  
430  
34  
35  
432  
36  
433  
37  
434  
38  
39  
435  
40  
436  
41  
437  
42  
43  
438  
44  
439  
45  
46  
440  
47  
441  
48  
442  
50  
443  
51  
444  
45  
54  
446  
53  
447  
57  
448  
58  
449  
59  
450  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 1: IPTp-SP dose uptake by study sites**



0dose=Women who did not take SP during pregnancy Dose<=2 pregnant women who took 1 or 2 doses as recommended by the old regimen

Dose>2 pregnant women who took at least 3 doses as recommended by the new regimen

1  
2  
45  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
45  
20  
21  
45  
22  
45  
23  
45  
24  
45  
25  
45  
26  
45  
27  
45  
28  
45  
29  
30  
45  
31  
45  
32  
45  
33  
45  
34  
45  
35  
45  
36  
45  
37  
45  
38  
45  
39  
45  
40  
45  
41  
45  
42  
45  
43  
45  
44  
45  
46  
45  
47  
45  
48  
45  
49  
45  
50  
45  
51  
45  
52  
45  
53  
45  
54  
45  
55  
45  
56  
45  
57  
45  
58  
45  
59  
45  
60  
45  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 3:** Relationship between birth weight and SP uptake by multivariate regression

	<b>Coefficients (Kg)</b>	<b>95% CI</b>	<b>p-value</b>
No SP uptake	Reference		
Overall effect			
1 or 2 IPTp-SP uptake <sup>a</sup>	0.25	[-0.08;0.57]	0.13715
≥3 IPTp-SP uptake <sup>b</sup>	0.36	[0.04;0.68]	0.02843
Multigravidae	Reference		
Primigravidae	-0.25	[-0.36;-0.13]	< 1e-04

<sup>a</sup> SP uptake of less than 3 doses (1 or 2 SP uptake) reflecting the old IPTp-SP policy recommendation, <sup>b</sup> SP uptake of 3 or more doses reflecting the proxy of the 2012 recommendation.

**Table 4:** Prevalence of Pfdhfr, Pfdhps, among pregnant women in study isolates

Gene	SNP*	Wild type, n (%)	Mutation, n (%)
<i>Pfdhfr</i> <sup>a</sup> (n = 112)	N51I	12 (10.71%)	100 (89.29%)
	C59R	3 (2.68%)	109 (97.32%)
	S108N	2 (1.79%)	110 (98.21%)
	I164L	111 (99.11%)	1 (0.89%)
<i>Pfdhps</i> <sup>b</sup> (n = 105)	S436A/F	29 (27.62%)	76 (72.38%)
	A437G	3 (2.86%)	102 (97.14%)
	K540E	105 (100%)	0
	A581G	82 (78.10%)	22 (20.90%)
	A613S/T	100 (95.24%)	5 (4.76%)

<sup>a</sup> *Pfdhfr*, dihydrofolate reductase; <sup>b</sup> *Pfdhps*, dihydropteroate synthase

**Table 5:** Evolution of the A581G mutation from inclusion to delivery

Mutated codons at <i>Dhps</i>	No. of positive isolates (%)		p-value
	First ANC (n=88)	Delivery (n=32)	
581			
+	10 (11.4%)	12(37.5%)	0.001

+: presence of A581G mutation

1  
2  
3  
498  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
499  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 6:** Prevalence of combined *pfdhfr/pfdhps* haplotypes in study isolates

Gene	category	Haplotype	n (%)
<i>pfdhfr/pfdhps</i> (n = 105)	wild type	NCSI-SAKAA	0
	double	ICNI_SGKAA	1 (0.95%)
	triple	NRNI-SGKAA	2(1.9%)
		ICNI-SGKGA	1 (0.95%)
	quadruple	IRNI-SGKAA	17 (16.19%)
		IRNI-A/FAKAA	3 (2.90%)
		IRNI-A/FAKAA	1 (0.95%)
		NRNI-A/FGKAA	8 (7.6%)
	quintuple	IRNI-A/FGKAA	49 (46.7%)
		IRNI_SGKGA	9 (8.57%)
		NRNI_A/FGKGA	1 (0.95%)
		IRSI_A/FGKGA	1 (0.95%)
	sixtuple	NRNI-A/FGKGS/T	1 (0.95%)
		<u>IRNI-A/FGKAS/T</u>	2 (1.90%)
		IRNI_A/FGKGA	6 (5.71%)
		IRNL_SGKGA	1 (0.95%)
	septuple	<u>IRNI-A/FGKGS/T</u>	2 (1.90%)

### 1.1.1.2. Difficultés rencontrées

Les travaux menés au cours de cette thèse n'ont pas été sans difficulté. Nous avons dû revoir nos objectifs à la suite de plusieurs contraintes d'ordre logistiques mais aussi méthodologiques.

L'un de nos objectifs était de faire une étude génomique sur les isolats ghanéens quand ceux-ci sont sous la pression de la SP. Cependant, faire une telle étude impliquait d'avoir les mêmes femmes infectées à la fois lors de leur première consultation prénatale mais aussi à l'accouchement.

Le suivi de nos femmes étant passif, beaucoup de femmes recrutées à la première consultation prénatale ne revenaient pas pour l'accouchement ou retiraient leur consentement. Finalement, nous avons très peu de femmes infectées aussi bien à la première consultation prénatale qu'à l'accouchement. Une autre difficulté d'ordre méthodologique s'était posée. En effet, pour faire du NGS (whole genome), il nous fallait de l'ADN parasitaire de bonne qualité. Or généralement, dans le sang infecté on a à la fois de l'ADN parasitaire et de l'ADN humain qui se retrouve de surcroît en plus grande quantité que l'ADN parasitaire. On avait donc plus de chance de séquencer l'ADN humain au lieu de l'ADN parasitaire. Des études proposaient plusieurs méthodes permettant d'avoir accès à l'ADN parasitaire (déleucocytation avant extraction d'ADN, Swga, etc...) qui avaient toutes leurs avantages et leurs inconvénients à savoir: nécessité de grands volumes de sang veineux, ou utilisation des colonnes garnies de cellulose faites maison ou des filtres commerciaux coûteux.

Des chercheurs de l'UMR261/IRD, en particulier Jérôme Clain avec qui nous avons eu des échanges sur les difficultés rencontrées et la meilleure méthode à considérer nous ont proposé une méthode de déleucocytation à laquelle ses collaborateurs et lui avaient commencé à réfléchir. Cette méthode bien que testée au laboratoire du Centre National de référence du paludisme (CNR paludisme) de Bichat n'avait cependant pas été validée et n'avait jamais été testée sur le terrain.

L'opportunité d'étudier le génome entier des parasites soumis à un traitement aux CATs nous a été offerte en la mise en place de l'étude BIOCER au Bénin. La méthode de filtration a pu être testée sur le terrain et validée. Grâce à cette méthode, la partie méthodologique de la deuxième partie de nos travaux de thèse a été une réussite. La mise au point et la standardisation de cette méthode a nécessité l'utilisation de sang parasité reconstitué et du sang de patient. La description de la méthode et les résultats obtenus à partir de celle-ci ont été entièrement décrits dans l'article 2 du chapitre 2 de cette thèse.

En conclusion les contraintes liées à la première partie des résultats obtenus sur le projet MAHEVA ont aidé à la réussite de la deuxième partie des travaux initiés sur le projet BIOCER.

## **Chapitre 2- Paludisme au Bénin: Cas pratique du projet BIOCER**

### **1.1.1. Justification du choix du Bénin**

La majorité des pays de l’Afrique Subsaharienne est endémique au paludisme et le Bénin n’y fait pas exception. Cette affection exerce une pression économique importante sur le développement du Bénin. Il représente 40% des consultations externes et 25% de toutes les admissions à l’hôpital<sup>133</sup>. En dépit des efforts déployés, le paludisme reste la principale cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans et de morbidité chez les adultes. Le système de santé du pays, bien que correct, n’est pas à la hauteur de celui de son voisin le Ghana et contribue fortement à cette situation.

Les limites du système de santé béninois affectent considérablement la qualité et l’exhaustivité des données et rapports pouvant aider à la surveillance du paludisme. Malgré cet état des choses, les données datant de 2019 montrent que sur plus de 50% des femmes ayant effectué au moins quatre consultations prénatales, seules 14% d’entre elles ont déclaré avoir reçu au moins trois doses de TPI-SP selon les recommandations de l’OMS. De plus, près de 38% des enfants âgés de moins cinq ans ont souffert du paludisme durant cette période<sup>134</sup>.

#### **1.1.1.1. Paludisme au Bénin**

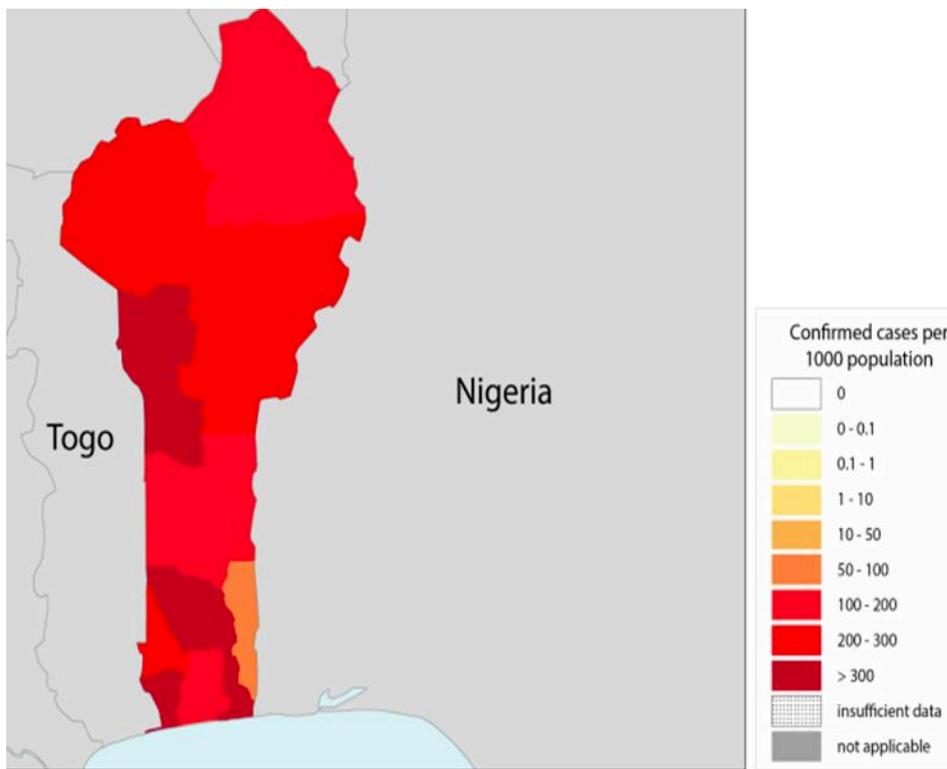
Le Bénin est un pays situé en Afrique de l’Ouest dans la zone tropicale entre l’Equateur et le Tropique du Cancer Est. Il a une superficie de 112 622 km<sup>2</sup> et possède deux types de climat. Au sud, un climat équatorial avec une forte humidité et une alternance de saisons sèches (de novembre à mars et de mi-juillet à mi-septembre) et de saisons des pluies (d’avril à mi-juillet et de mi-septembre à octobre). Au centre et au nord, le climat est tropical, caractérisé par une saison sèche de novembre à avril, et une saison des pluies de juin à septembre. (Annuaire des statistiques sanitaires 2018 du ministère de la Santé du Bénin).

Selon la RGPH (2013), le Bénin possède une population de 11 554 473 d’habitants dont 1 818 666 sont des enfants âgés de moins de cinq ans. Le Bénin se trouve dans la même zone intertropicale que son voisin le Ghana. Par conséquent, la situation environnementale et sanitaire du Bénin ressemble beaucoup à celle de ce dernier et est essentiellement caractérisée par des pathologies tropicales variées, avec une prédominance du paludisme.

Le paludisme est endémique au Bénin et, bien que la transmission soit stable, elle est influencée par plusieurs facteurs, notamment les espèces de vecteurs, la géographie, le climat et l’hydrographie. Le

principal vecteur du paludisme au Bénin est *Anopheles gambiae s.s.*, mais les vecteurs secondaires (*Anopheles funestus* et *Anopheles melas*) sont également importants pour sa transmission (President's Malaria Initiative). Bien que l'on note la présence de quelques cas de *P. malariae*, l'OMS considère que l'espèce parasitaire responsable de la maladie est constituée à 100% de *P. falciparum*.

Le système de santé béninois ayant des limites, on note l'indisponibilité des données exhaustives sur le paludisme. Cependant, il ressort selon l'annuaire des statistiques sanitaires de 2018, que le paludisme est la première cause de consultation et correspond à 45,8% des affections fréquemment notifiées dans la population générale. Le taux d'incidence du paludisme est de 11,8 pour 100 habitants. Cette incidence est nettement plus élevée chez les enfants de moins d'un an chez qui elle atteint 45,9 % et 21,8 % chez ceux âgés de un à quatre ans<sup>133</sup>.



**Figure 13:** Rapport mondial sur le paludisme en 2018 ; Profil épidémiologique du Bénin<sup>133</sup>

#### 1.2.1.1.1. Système sanitaire du Bénin

En 2015, dans le cadre de la coopération entre l'OMS et le Bénin pour la période 2016 - 2019, l'état des lieux du système sanitaire béninois révélait certes des avancées dans la prise en compte des

priorités dudit secteur, mais également l'existence de certaines difficultés majeures. Au nombre de celles-ci figurent la faible réduction de la mortalité, la persistance des maladies infectieuses, la très forte augmentation des maladies non transmissibles et les faibles performances du système de santé. Malgré les différentes réponses envisagées et mises en œuvre par les acteurs jusqu'en 2016, le système sanitaire demeure confronté à des défis majeurs ; ce qui rend parfois difficile l'accès aux soins de qualité pour tous. Le système de santé du Bénin a une structure pyramidale inspirée du découpage administratif ; il comporte trois différents niveaux :

- Le niveau central ou national assure la mise en œuvre de la Politique Sanitaire définie par le gouvernement. Il est administré par le ministre de la Santé. Ce niveau comporte les structures de référence telles que : le Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM), dont les deux vocations sont la recherche et la formation ; le Centre National Hospitalier de Pneumo-phtisiologie (CNHPP) ; le Centre National Hospitalier de NeuroPsychiatrie (CNHNP) et le Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant - Lagune (CHU-MEL).
- Après le niveau central, on a le niveau intermédiaire ou départemental qui est administré par les Directeurs départementaux de santé. Les activités sanitaires se font à ce niveau dans les hôpitaux départementaux. Les Directions Départementales de la Santé (DDS) sont chargées de mettre en œuvre la politique sanitaire définie par le gouvernement, de planifier et de coordonner toutes les activités des services de santé tout en assurant la surveillance épidémiologique dans les départements. Le Centre Hospitalier Départemental (CHD) constitue le centre de référence pour les cas référés par les hôpitaux de zone (pour ceux qui sont fonctionnels) ou par les centres de santé.
- Le niveau périphérique quant à lui représente l'entité opérationnelle la plus décentralisée du système sanitaire. En effet, le territoire national est réparti en 34 zones. Chaque zone dénommée Zone Sanitaire (ZS) regroupe un certain nombre de services de santé public de premier contact : les centres de santé d'arrondissement ou de commune. A ces infrastructures s'ajoutent les dispensaires ou maternités isolés, les unités villageoises de santé (UVS) ; toutes ces structures de soins sont appuyées par un hôpital de référence (public ou privé), appelé Hôpital de Zone (HZ) qui constitue le premier niveau de référence de la ZS (Annuaire des statistiques sanitaires 2018 du ministère de la Santé du Bénin).

Les travaux de terrain réalisés lors du second projet auquel nous avons participé durant cette thèse se sont déroulés dans les départements du Littoral et de l'Atlantique et plus précisément dans les communes de Cotonou à l'Hôpital de la mère et de l'enfant et celle de Ouidah à l'hôpital de zone de Ouidah. Le CHUMEL se retrouve au niveau central du système sanitaire et est entièrement consacré à la mère et à l'enfant. Presque tous les cas grave de paludisme y sont référés.

#### **1.2.1.1.2. Prise en charge du paludisme au Bénin**

Le Bénin à l'instar des autres pays d'Afrique où sévit le paludisme, a suivi la politique d'éradication préconisée par l'OMS dans les années 50. Il a également mené la politique de contrôle de l'endémie palustre par la chimio-prophylaxie de masse avant de l'arrêter et passer à la prise en charge des cas avec la Chloroquine.

Avec l'apparition de la résistance du parasite aux antipaludiques au Bénin (35,2% avec la chloroquine et 22,8% avec la SP en 2002), le pays a changé de politique et a adopté les CTAs depuis 2008 pour la prise en charge des cas simples de paludisme en plus de la mise à disposition des TDRs dans les formations sanitaires.

Dès 2011, le Bénin est passé du traitement présomptif chez les enfants de moins de cinq ans à la mise à l'échelle de la confirmation systématique et obligatoire de tous les cas suspects. Dans une vision scientifique, l'adoption de l'approche « confirmation obligatoire avant traitement » s'est avéré nécessaire pour mesurer l'ampleur de la maladie et prévenir la résistance précoce des parasites aux CTAs.

Face à cette évidence, l'OMS a recommandé des directives qu'il s'est avéré indispensable d'intégrer sur la base des données factuelles de chaque pays. Directives que le Bénin a adopté tout en l'adaptant à sa situation et qui s'adressent à tous les acteurs de la lutte contre le paludisme.

##### **1.1.1.1.2.1. Recommandations thérapeutiques dans le cas du paludisme simple et du paludisme grave**

Les CTAs représentent le traitement recommandé pour tous les cas de paludisme simple à *Plasmodium*, y compris ceux des enfants, des personnes vivant avec le syndrome d'immunodéficience acquise provoqué par le virus de l'immunodéficience acquise (VIH/SIDA), et des femmes enceintes au cours des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres.

Les molécules retenues pour le traitement du paludisme simple par la politique nationale sont : l'artéméther-luméfantrine et l'artésunate-amodiaquine tandis que dans le cas de la prise en charge du paludisme grave, les dérivés d'artémisinine ou les sels de quinine sont les molécules recommandées sont.

➤ **Dérivés d'artémisinine :**

Les dérivés d'artémisinine les plus utilisés sont l'artésunate et l'artéméther.

L'artésunate est administrée en intraveineuse libre (IVL) ou en intra musculaire (IM) à raison de 2,4mg/kg en première dose à l'admission, à 12 heures et 24 heures post admission. A partir du deuxième jour, l'administration de l'artésunate se fait une fois par jour à la même heure jusqu'à ce que le malade puisse prendre un traitement complet de CTA par voie orale.

L'artéméther quant à lui, est administré en IM à raison de 3,2mg/kg le premier jour, puis 1,6 mg/kg par jour à la même heure. Le relais se fera par un traitement complet de CTA (3 jours) dès que le malade est en mesure de s'alimenter.

Ce schéma thérapeutique est applicable dans les formations sanitaires dotées de structure d'hospitalisation, d'un laboratoire adapté et disposant de personnel ayant les compétences requises.

**NB :** Les trois premières doses par voie parentérale sont obligatoires.

➤ **Sels de quinine :**

La quinine est utilisée à raison de 10 mg/kg toutes les huit heures en perfusion de 4 heures de temps avec du sérum glucosé (SG) 10% (20 à 25 ml/kg/prise chez l'enfant) en tenant compte rigoureusement du poids de l'enfant lors du calcul de la dose de quinine;

Le relais est pris par voie orale dès que possible et la durée totale du traitement est de sept jours. Les trois premières perfusions sont obligatoires.

**1.1.1.1.2.2. Recommandations dans le traitement des cas particuliers**

Les cas de paludisme simple chez la femme enceinte et les enfants de moins de cinq ans sont considérés et traités comme des urgences.

Dans le cas des femmes enceintes, la politique de lutte contre le paludisme recommande (i) la quinine pour le traitement du paludisme au premier trimestre, (ii) les CTAs aux 2ème et 3ème trimestres. Dans le cas des enfants âgés de moins de cinq ans, cette même politique recommande le même traitement que chez l'adulte sauf chez l'enfant de moins de six mois où l'Artémether-Luméfantrine est contre indiqué.

### **1.1.2.2. Cas pratique du projet BIOCER**

BIOCER - Identification de biomarqueurs à usage pronostic du paludisme grave et du neuropaludisme est un projet qui a débuté en 2017 et a pris fin en 2019. L'originalité de l'étude BIOCER était de pouvoir suivre les enfants souffrant de paludisme grave le jour de leur admission et un mois après leur admission ; de les comparer avec des enfants souffrant de paludisme simple. L'étude BIOCER a enrôlé 347 enfants souffrant de tous types de paludisme. Les communes de Porto Novo, Cotonou et Ouidah ont été choisies pour la mise en œuvre de ce projet. Les sites choisis résultent à la fois d'un choix pragmatique (la distance entre Porto Novo-Cotonou (35km) et celle de Ouidah-Cotonou (42Km)) et scientifique dans la mesure où les zones choisies sont urbaines avec une constante augmentation du paludisme ces 20 dernières années. Les résultats issus de ce projet sont également en cours de valorisation.

#### **1.2.1.2.1. Description du Projet**

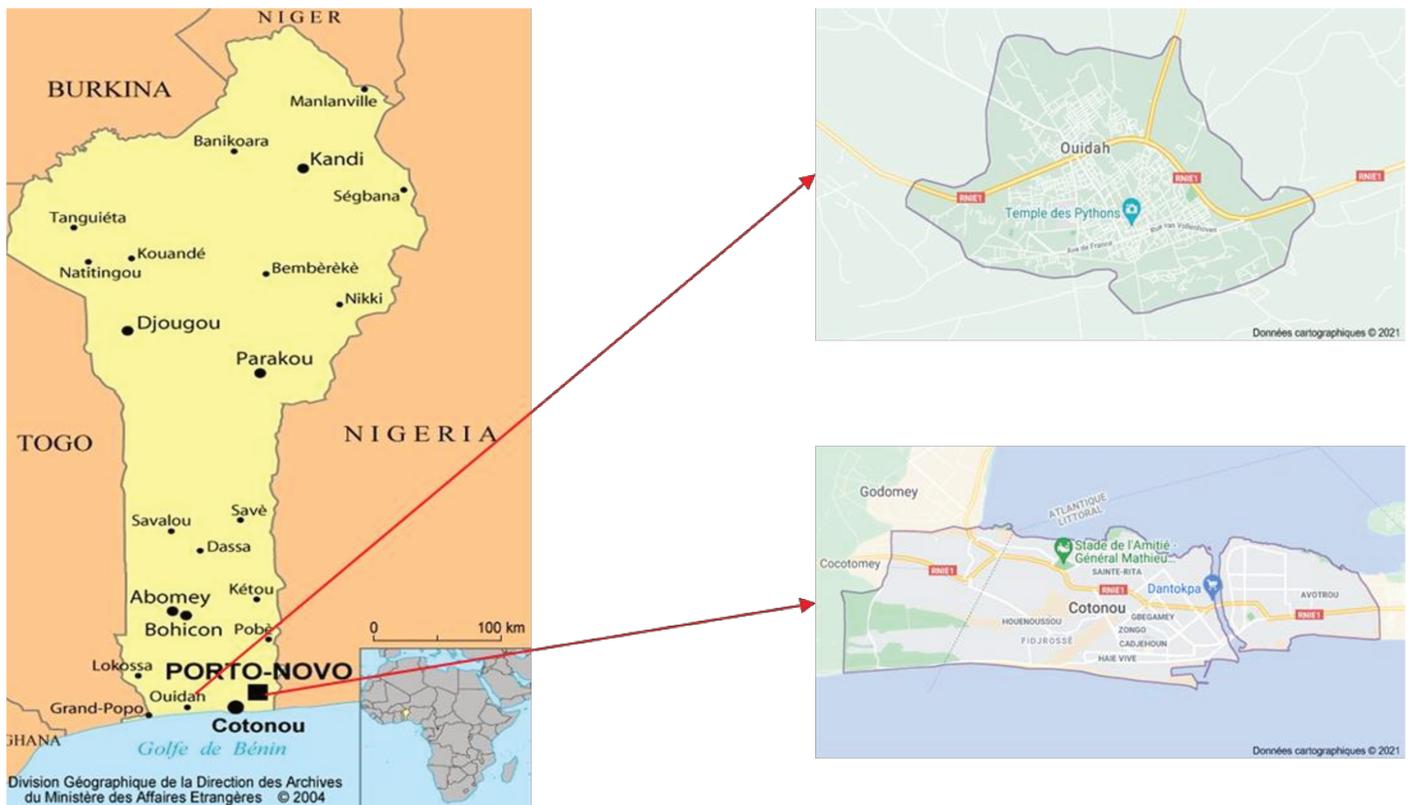
Le paludisme grave et le neuropaludisme représentent les formes graves du paludisme. Généralement les enfants âgés de moins de cinq ans et les personnes naïves (c'est-à-dire, qui n'ont jamais souffert du paludisme) en sont les premières victimes. Malgré le fait que beaucoup d'efforts et de moyens de lutte aient été mis en place pour lutter contre la maladie, il n'en demeure pas moins que près de 274 000 enfants soient décédés du paludisme en 2019. Cette situation serait probablement due au fait que des sujets ou patients n'aient pas été très vite diagnostiqués, qu'il y ait une erreur de diagnostic dans la forme du paludisme ou que le traitement administré ne soit pas approprié au type de paludisme.

Tahar et ses collaborateurs ont pensé qu'il serait intéressant d'identifier des biomarqueurs permettant de caractériser le type de paludisme en initiant en 2016 une étude dont l'objectif était de déterminer l'implication relative des médiateurs inflammatoires tels que (Neopterin, sCD163, suPAR,

Pentraxin 3 (PTX3), sCD14, Fractalkine (CX3CL1), sTREM-1 and MIG (CXCL9)) dans la pathogenèse du paludisme et de tester leur pertinence en tant que biomarqueurs de la gravité de la maladie.

Le projet BIOCER est donc parti de ces résultats et se trouve dans la même continuité d'idée. Il a été conçu pour identifier des molécules capables de distinguer les différentes formes du paludisme, utilisables comme biomarqueurs pour mieux caractériser la pathologie du paludisme grave et du neuropaludisme. Ces molécules ont été sélectionnées en fonction de la pertinence de leur rôle biologique ainsi que des résultats obtenus par Tahar et ses collaborateurs en 2016. Elles peuvent potentiellement prédire les complications du paludisme et distinguer les enfants à risque de mourir. Le taux de plusieurs de ces molécules solubles comprenant des chemokines, des cytokines, des activateurs endothéliaux et des analytes biologiques provenant de l'activation des monocytes /macrophages chez des enfants atteints de paludisme caractérisés par des manifestations cliniques distinctes au moment de l'accès et après leur convalescence a été examiné.

Le projet BIOCER s'est déroulé de Janvier 2018 à Octobre 2019 dans des hôpitaux (CHU de Suruléré, CHD de Porto Novo, CHU de Homel, Hôpital de zone de Ménontin et Hôpital de zone de Ouidah) situés dans trois communes du Bénin (Porto Novo, Cotonou et Ouidah). Deux raisons ont guidé le choix de ces différents sites. La première était liée à la proximité des sites avec le laboratoire du CERPAGE où tous les travaux de laboratoire devaient avoir lieu (figure 14). La seconde raison était due au fait que ces hôpitaux étant des centres de référence, il y avait de fortes chances d'y rencontrer toutes les formes de paludisme. En plus, l'équipe de l'UMR 261/ CERPAGE avaient déjà collaboré avec ces hôpitaux.



**Figure 14:** Carte du Bénin et des deux sites sur lesquels la collecte des échantillons filtrés a été effectuée.

Trois sites répartis dans trois communes différentes ont été retenus pour le projet BIOCER. Les échantillons qui ont fait l'objet de nos travaux proviennent des communes de Cotonou et de Ouidah.

#### 1.2.1.2.2. Déroulement de l'étude

Il s'est agi d'un suivi longitudinal de cohorte d'enfants âgés de moins de cinq ans et souffrant de paludisme simple et de paludisme grave à l'admission, 18 heures après le premier traitement, trois jours après le début du traitement et 30 jours après l'admission.

Pour être inclus dans l'étude, en plus du critère d'âge, la confirmation du paludisme (simple ou grave) à *P. falciparum* a été faite à la microscopie par une goutte épaisse et un frottis sanguin ; le formulaire de consentement éclairé écrit par des parents ou tuteurs légaux de chaque participant devait être signé.

L'étude BIOCER a été approuvée par le comité d'éthique de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées du Bénin.

A l'inclusion, les données démographiques (lieu de résidence, âge, sexe etc.), biologiques (sang veineux prélevés sur EDTA) et cliniques (taille, poids, âge, température, pression etc.) ont été recueillies.

Puis, des analyses hématologiques (Hb, Hématocryte, VGM, TCMH, CCMH, Plaquette, NB, PN, PB), biochimiques (créatinine, Glycémie, Créatinémie, CRP, Na<sup>+</sup>, K ...) et parasitologiques (Goutte épaisse, Densité parasitaire, filtration du sang et extraction de l'ADN parasite) ont été effectuées. Selon le diagnostic posé, les enfants étaient rapidement pris en charge et étaient systématiquement traités selon les recommandations nationales du ministère de la santé béninois et la disponibilité des antipaludiques.

Les analyses hématologiques et biochimiques étaient réalisées au niveau des laboratoires de chaque site. Les échantillons biologiques collectés étaient convoyés de façon journalière au laboratoire du CERPAGE pour la réalisation des analyses parasitologiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons intégré cette équipe en fin février 2019 et participé à la collecte et à la préparation des échantillons pour des analyses ultérieures entre février et mai 2019. A cette période, un amendement avait été apporté au protocole. Celui-ci consistait à inclure une étape de filtration du culot sanguin afin de ne garder que les globules rouges infectés (ADN parasite). Par conséquent, seule une petite partie des données de cette étude limitée à un certain nombre d'échantillons collectés à Cotonou et Ouidah dont le culot a été filtré a été exploitée dans cette partie de notre travail. L'objectif était de vérifier si le traitement par dérivé d'artémisinine ne sélectionne pas des populations parasites intra hôte au cours du traitement. Grâce à cette étude, nous étions en mesure d'étudier les allèles mineurs pour essayer de comprendre la dynamique de la sélection des parasites portant des mutations même au niveau des allèles mineurs par les dérivés d'artémisinine.

#### **1.1.1.2.2.1. Echantillonnage**

L'objectif poursuivi en participant à ce projet était d'étudier la dynamique de *P. falciparum* au cours d'un traitement à base d'artémisinine. Pour y parvenir un volet investigation génomique a été rajouté au projet au travers de l'amendement apporté à ce projet à partir de Janvier 2019. Sur la base de l'objectif que nous nous étions fixés et des analyses prévues, nous avons choisi de n'utiliser que des données biologiques collectés à l'inclusion avant tout traitement (D0) et 18h après le début du traitement (D1). Cet intervalle de 18 heures a été choisi en se basant sur l'expérience des praticiens que nous avons côtoyés et qui estimaient qu'au bout de 24 heures, il était peu probable de trouver des parasites dans nos échantillons.

Au total, 347 enfants souffrant de paludisme simple et de paludisme grave ont été recrutés dans les trois communes concernées. Parmi eux, 180 ont été recrutés avant l'amendement et 167 après amendement (les échantillons provenant de ces derniers ont été filtrés). Du sang veineux a été prélevé

chez chacun d'eux et des analyses hématologiques et biochimiques ont été effectuées sur site. Une quantité variable de sang a été ramenée au CERPAGE pour réaliser les travaux de laboratoire requis dans la réalisation de ce projet.

Une fois au CERPAGE, la présence de *P. falciparum* a été confirmée grâce au TDR et à la microscopie (gouttes épaisses et frottis sanguins). Des confettis ont ensuite été préparés. Le sang restant a été centrifugé et les différents composants (plasma, buffy coat et culot de globules rouges) ont été recueillis dans des tubes appropriés. La technique de filtration mise en place dans l'article 2 a été appliquée avec quelques petites modifications à tous nos culots globulaires. Les résultats de la filtration ont été envoyés à l'institut Cochin pour du whole genome sequencing (WGS), pendant que le reste des composants a été conservés soit dans de l'azote liquide, soit à -80 et -20 °C pour des analyses ultérieures en fonction du matériel biologique.

#### **1.1.1.2.2.2. Séquençage des isolats béninois**

##### **➤ Préparation des confettis et préparation des culots globulaires en vue de la filtration**

Pour chaque enfant recruté, des prélèvements du sang périphérique ont été effectués, deux gouttes de 50 µL de sang total ont été déposés sur du papier filtre Whatman 3 MM. Les confettis ainsi réalisés ont ensuite été séchés. Parallèlement, une goutte épaisse et un frottis sanguin ont été confectionnés.

Le reste du sang est ensuite centrifugé. Le plasma est prélevé et du cryo et du trizol ont également été effectués dans le but de conserver des parasites et l'ARN parasite. A partir du reste du culot globulaire, les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) ont été recueillies grâce au protocole d'Adams et al, 2017.

Une fois les PBMCs recueillies, la méthode de filtration décrite dans l'article 2 (article méthodologique) a été appliquée à tous les culots globulaires provenant des enfants recrutés à partir de février 2019.

##### **➤ Méthode de filtration**

Brièvement, la méthode consiste à diluer le culot globulaire obtenu après filtration avec du RPMI à 25% d'hématocrite. Ensuite, le mélange est filtré à l'aide d'un filtre "Minisart NML® syringe" de 5 µm qui retient les globules blancs porteurs de l'ADN humain et dont le diamètre est assez grand pour ne pas les laisser passer à travers le filtre. Un éluat est donc obtenu après filtration. Ce dernier est centrifugé

afin de récupérer un culot globulaire riche en ADN parasitaire qui servira pour l'extraction d'ADN par la suite.

### ➤ **Extraction et dosage d'ADN**

L'extraction de l'ADN a été effectuée sur les culots globulaires obtenus après filtration à l'aide du QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, France) conformément à la recommandation du fabricant. L'ADN total a été quantifié à l'aide du kit Qubit® dsDNA high sensitivity (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fabricant afin de déterminer s'il y avait suffisamment de matériel pour le séquençage.

### ➤ **Whole genome sequencing (NGS)**

Une fois l'ADN extrait et dosé, le séquençage du génome entier a été réalisé à l'aide du séquenceur Illumina Nextseq 500. Des bibliothèques d'ADN génomique contenant au moins 0,5 µg d'ADN ont été construites pour le séquençage à haut débit à l'aide du kit de préparation KAPA hyper Prep (Kapa Biosystems, Woburn, MA). La fragmentation de l'ADN a été effectuée mécaniquement avec le Covaris S220 à travers le microTube-50 AFA Fiber-Cap (Covaris®) en utilisant un réglage de 30% du facteur de service, une puissance d'incidence de pointe de 100W, et 1 000 cycles par rafale pendant 150 secondes. Des fragments d'ADN variant généralement de 150 à 250 pb ont été obtenus grâce à cette méthode. L'ADN a été purifié et la sélection de la taille des fragments est faite avec les billes AMPure Agencourt (XP). La qualité et la quantité des bibliothèques d'ADN ont été vérifiées en utilisant le Qubit® pour la concentration et le BioAnalyser 2100 Agilent pour la taille des fragments. Les librairies ont enfin été séquencées à l'aide d'Illumina NextSeq 500 à l'Institut Cochin, plateforme GENOM'IC (Paris, France) pour des lectures de 150 pb en paired-end.

### ➤ **Deep sequencing**

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons effectué du deep sequencing qui consiste en la combinaison d'une amplification par PCR suivie du NGS tel que décrit précédemment. C'est une méthode NGS capable de séquencer à de grandes profondeurs une région génomique. Deux gènes d'intérêt (*pfdhfr* et *pfk13*) ont été ciblés et une amplification par PCR a été effectuée. Les volumes des différents réactifs pour l'amplification d'un échantillon, les amorces et les conditions d'amplification PCR utilisées sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau 5** : Volume utilisé pour l'amplification d'un échantillon pour les isolats du Bénin

Mix preparation for one sample (25uL)		
Taq polymerase promega	k13	dhfr
MgCl2	3	3
Tp 10X	5	5
dNTPs	2	2
amorce upper	0.05	0.25
amorce lower	0.05	0.25
Taq promega	0.25	0.25
H2O	13.65	13.25

**Tableau 6** : Conditions d'amplification des différentes PCR pour les isolats du Bénin

Condition d'amplification de <i>pfk13</i> (PCR1 et 2)		Condition d'amplification <i>pfdhfr</i> (PCR1)	Condition d'amplification <i>pfdhfr</i> (PCR2)
94°C 5min		94°C 3 min	94°C 3 min
94°C 30 sec		92°C 30 sec	92°C 30 sec
60°C 1 min30 sec	X 40	45°C 45 sec	50°C 45 sec
72°C 1 min30 sec	cycles	65°C 45 sec	65°C 45 sec
72°C 10 min		65°C 3 min	65°C 3min
15°C INFINI		4°C INFINI	4°C INFINI

**Tableau 7** : Différentes séquences d'amorces utilisées pour les isolats du Bénin

	<i>pfk13</i> séquence	<i>pfdhfr</i> séquence
Amorces PCR1	n1_k13S: CGGAGTGACCAAATCTGGGA	AMP1F: 5'-TTTATATTTTCTCCTTTTAA-3'
	n1_k13AS: GGGAATCTGGTGGTAACAGC	AMP2R: 5'-CATTTTATTATTATTCGTTTTCT-3'
Amorces PCR2	n2_k13S: GCCAAGCTGCCATTCATTTG	AMP2R: 5'-CATTTTATTATTATTCGTTTTCT-3'
	n2_k13AS: GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA	AMP3F: 5'-TGATGGAACAAGTCTGCGAC-3'

Les amplicons obtenus ont été par la suite séquencés à des profondeurs très élevées.

Cette méthode a été utilisée pour permettre la détection des mutations dans les populations minoritaires et la détection des mutations rares. Grâce à cette méthode, nous avons pu calculer le taux de mutation des différents gènes ciblés et séquencés.

### **1.1.2.3. Résultats**

Deux articles viennent valoriser la deuxième partie de nos travaux.

L'article 2 est un article méthodologique qui a été produit au vu des contraintes et différentes faiblesses relevées au cours de la réalisation de nos travaux sur le projet MAHEVA et qui n'ont pas permis l'atteinte de nos objectifs. Il s'agit d'une méthode de filtration des parasites de *P. falciparum* mis en place et utilisée pour répondre aux objectifs des travaux sur le projet BIOCER initié au Bénin. Cet article a été soumis à Malaria Journal.

L'article 3 quant à lui vient valoriser les travaux menés sur le projet BIOCER. Cet article en cours de finalisation présente de façon détaillée une partie des résultats sur la sélection des parasites portant des mutations retrouvées dans des sous populations parasitaires par l'utilisation de trois doses d'arténusate (dans le traitement du paludisme grave) et l'arthémether lumefantrine (dans le traitement du paludisme simple).

## **ARTICLE 2: 5WBF: A simple and low-cost filtration method of whole blood suitable for whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* clinical isolates**

### **Objectifs de l'étude**

L'objectif principal de cette étude était d'optimiser les résultats de séquençage grâce à la mise au point d'une méthode de filtration à faible coût permettant de séparer l'ADN parasitaire de l'ADN génomique.

### **Résultats clés**

Grâce aux travaux réalisés au cours de cette étude, nous avons réussi à mettre au point une méthode de filtration appelée 5WBF. Les parasitémies des différents isolats utilisés pour la mise au point et la standardisation de cette méthode de filtration variaient entre 0,02% à 5,5%. Les résultats obtenus grâce à la méthode 5WBF, montrent que la couverture du génome variait peu en fonction de la parasitémie. Mais aussi que de très faibles quantités d'ADN pouvaient générer des données de séquençage de très bonne qualité. Des gènes d'intérêt ont été extraits et comme pour le génome complet, on couvrait totalement les gènes d'intérêt à une profondeur de 10X. Quand on compare les résultats obtenus avec ceux du sWGA, on remarque que tous les génomes de *P. falciparum* sont couverts à plus de 95% et que cette couverture était homogène contrairement au sWGA qui ne couvre pas du tout le génome des apicoplastes et mitochondrial; suggérant qu'avec notre méthode, la détermination du copy number variation était possible, ce qui n'est pas possible avec le sWGA.

1 **5WBF: A low-cost and straightforward whole blood**  
2 **filtration method suitable for whole-genome sequencing of**  
3 ***Plasmodium falciparum* clinical isolates**

4  
5  
6 Romain Coppée<sup>1,‡</sup>, Atikatu Mama<sup>1,\*</sup>, Véronique Sarrasin<sup>1,2,\*</sup>, Claire Kamaliddin<sup>2,3</sup>, Lucie  
7 Adoux<sup>4</sup>, Lawrence Palazzo<sup>1</sup>, Nicaise Tuikue Ndam<sup>1</sup>, Franck Letourneur<sup>4</sup>, Frédéric Arieu<sup>5</sup>,  
8 Sandrine Houzé<sup>1,2</sup>, Jérôme Clain<sup>1,2,‡</sup>

9  
10 <sup>1</sup> Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France

11 <sup>2</sup> Centre National de Référence du Paludisme, Hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, F-  
12 75018 Paris, France

13 <sup>3</sup> Cumming School of Medicine, Pathology and Laboratory Medicine, The University of  
14 Calgary, Calgary, Alberta, Canada

15 <sup>4</sup> Cochin Institute, INSERM U1016, UMR CNRS 8104, Genomic Platform, F-75014 Paris,  
16 France

17 <sup>5</sup> Université de Paris, INSERM 1016, Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin, F-  
18 75014 Paris, France

19  
20 \* Contributed equally to this work

21 ‡ Correspondence and requests should be addressed to Romain Coppée and Jérôme Clain  
22 (email: [romain.coppee@gmail.com](mailto:romain.coppee@gmail.com); [jerome.clain@u-paris.fr](mailto:jerome.clain@u-paris.fr))

## 23 **ABSTRACT**

24

### 25 **Background**

26 Whole-genome sequencing (WGS) is becoming increasingly helpful to assist malaria control  
27 programs. A major drawback of this approach is the large amount of human DNA compared  
28 to parasite DNA extracted from unprocessed whole blood. As red blood cells (RBCs) have a  
29 diameter of about 7-8  $\mu\text{m}$  and exhibit some deformability, we hypothesized that cheap and  
30 commercially available 5  $\mu\text{m}$  filters might retain leukocytes but much less of *Plasmodium*  
31 *falciparum*-infected RBCs. This study aimed to test the hypothesis that such a filtration  
32 method, named 5WBF (for 5  $\mu\text{m}$  Whole Blood Filtration), may provide highly enriched  
33 parasite material suitable for *P. falciparum* WGS.

### 34 **Methods**

35 Whole blood was collected from five patients experiencing a *P. falciparum* malaria episode  
36 (ring-stage parasitemia range: 0.04-5.5%) and from mock samples obtained by mixing  
37 synchronized, ring-stage cultured *P. falciparum* 3D7 parasites with uninfected human whole  
38 blood (final parasitemia range: 0.02-1.1%). These whole blood samples (50 to 400  $\mu\text{L}$ ) were  
39 diluted in RPMI 1640 medium or PBS 1X buffer and filtered with syringes connected to a 5  
40  $\mu\text{m}$  commercial filter. DNA was extracted from filtered and unfiltered counterpart blood  
41 samples using a commercial kit. The 5WBF method was evaluated on the ratios of  
42 parasite:human DNA assessed by qPCR and by sequencing depth and percentages of  
43 coverage from WGS data (Illumina NextSeq 500). As a comparison, we also applied to the  
44 same unprocessed whole blood samples the selective whole-genome amplification (sWGA)  
45 method which does not rely on blood filtration.

### 46 **Results**

47 After applying 5WBF, qPCR indicated an average of 2-fold loss in the amount of parasite  
48 template DNA (Pf *ARN18S* gene) and from 4,096- to 65,536-fold loss of human template  
49 DNA (human  *$\beta$  actin* gene). WGS analyses revealed that > 95% of the nuclear genome and  
50 the entire whole organellar genomes were covered at  $\geq 10\times$  depth for all samples tested. In  
51 sWGA counterparts, none of the organellar genomes were covered, and from 47.7 to 82.1%  
52 of the nuclear genome was covered at  $\geq 10\times$  depth depending on parasitemia. Sequence  
53 reads were homogeneously distributed across gene sequences for 5WBF-treated samples ( $n$   
54 = 5,460 genes; mean coverage: 91 $\times$ ; median coverage: 93 $\times$ ; 5<sup>th</sup> percentile: 70 $\times$ ; 95<sup>th</sup>  
55 percentile: 103 $\times$ ), allowing the identification of gene copy number variations such as for  
56 *gch1*. This later analysis was not possible for sWGA-treated samples, as we observed a  
57 much more heterogeneous distribution of reads among gene sequences (mean coverage:  
58 80 $\times$ ; median coverage: 51 $\times$ ; 5<sup>th</sup> percentile: 7 $\times$ ; 95<sup>th</sup> percentile: 245 $\times$ ).

### 59 **Conclusions**

60 The novel 5WBF leucodepletion method is simple to implement and based on commercially  
61 available, standardized, 5  $\mu\text{m}$  filters which cost from 1.0 to 1.7€ per unit, depending on  
62 suppliers. 5WBF permits extensive genome-wide analysis of *P. falciparum* DNA from minute  
63 amounts of whole blood even with parasitemias as low as 0.02%.

64

65 **Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, Leucodepletion; Whole-genome sequencing

## 66 INTRODUCTION

67

68 Whole-genome sequencing (WGS) has revolutionized genome-wide analyses [1]. In the  
69 context of *Plasmodium falciparum* surveillance, WGS is helpful for example to analyze the  
70 structure of parasite populations [2,3] and to identify and track gene mutations conferring  
71 resistance to antimalarial drugs [4,5]. A major drawback of WGS is the large amount of  
72 human DNA compared to parasite DNA when extracted from unprocessed whole blood.  
73 Several protocols have been developed to enrich parasite DNA before WGS, either by  
74 filtering out leukocytes before DNA extraction or by selectively amplifying the parasite  
75 genome (sWGA). Current filtration procedures based on leucodepletion are however limited  
76 because they require large volumes of venous blood [6] or use either home-made cellulose-  
77 packed columns [7] or costly commercial filters [8]. Regarding sWGA-based methods [9–11],  
78 studies reported a large proportion of unmapped reads to the *P. falciparum* genome [12], the  
79 absence of coverage of the organellar genomes [9], and a wide heterogeneity in read  
80 distribution across the nuclear genome [9]. Altogether, there is a need to improve clinical  
81 sample preparation to increase data quality and exhaustiveness for *P. falciparum* genomic  
82 studies while limiting the cost of data production.

83 Mature red blood cells (RBCs) have a resting long diameter of about ~8  $\mu\text{m}$  and exhibit some  
84 deformability [13]. Using a microfluidic device to examine the traversal of a RBC, the  
85 diameters of the smallest equivalent cylindrical tube, through which uninfected and  
86 parasitized RBCs could pass, were similar (2.78 and 2.79 respectively) [13]. Human  
87 leukocytes are larger cells than RBCs and have diameters ranging from 9 to 21  $\mu\text{m}$   
88 depending on cell types. Hence, we hypothesized that commercially available filters with a  
89 pore size of 5  $\mu\text{m}$  might retain DNA-carrying human leukocytes but not *P. falciparum*-infected  
90 RBCs. Such a filtration could provide samples highly enriched in parasites, suitable for  
91 downstream WGS workflow. On this basis, we developed 5WBF (5  $\mu\text{m}$  Whole Blood  
92 Filtration), a low-cost and simple blood filtration procedure using a commercial, standardized  
93 5  $\mu\text{m}$  filter (Minisart NML® syringe, Sartorius AG, Germany). To develop 5WBF, 400  $\mu\text{L}$  of  
94 whole blood at variable parasitemias (from 0.022 to 1.1%) was first tested from mock  
95 samples made by mixing synchronized, ring-stage cultured *P. falciparum* parasitized  
96 erythrocytes (3D7) with uninfected human whole blood. Then 5WBF was validated using 50  
97 and 200  $\mu\text{L}$  of whole blood (ring-stage parasitemia range: 0.04-5.5%) from patients  
98 experiencing a *P. falciparum* malaria episode. DNA extracts obtained after 5WBF were then  
99 evaluated using the parasite:human DNA ratio assessed by qPCR and the performance of  
100 sequencing depth and percentages of coverage obtained through WGS data compared with  
101 sWGA.

102

## 103 MATERIALS AND METHODS

### 104 *P. falciparum* culture and infected whole blood reconstitution

105 Mock whole blood samples were obtained by mixing a synchronized ring-stage *P. falciparum*  
106 culture (O-negative blood, 3D7 parasite strain) with uninfected human whole blood (final  
107 parasitemia range: 0.022-1.1%). 3D7 parasites were cultured at 37°C under specific  
108 atmospheric conditions (10% oxygen, 5% carbon dioxide and 85% nitrogen) in 10% human  
109 serum containing RPMI 1640 medium. One volume of pelleted culture at 10% parasitemia  
110 was diluted in ten volumes of non-infected human whole blood. The mock sample  
111 parasitemia was then estimated to be 1.1% by Diff Quick™-stained thin blood film. The  
112 sample was then diluted 1:5 followed by another 1:10 dilution in the negative human whole  
113 blood as three independent replicates. The parasitemias were then estimated by Diff  
114 Quick™-stained thin blood film to be 0.23% and 0.022% for the two diluted samples,

115 respectively. These reconstituted, infected whole blood samples were hereafter called mock  
116 samples.

### 117 **Infected whole blood from *P. falciparum* malaria patients**

118 Five fresh blood samples (collected on EDTA) from imported *P. falciparum* malaria cases  
119 diagnosed and treated at Bichat-Claude Bernard Hospital (French Malaria Reference Center,  
120 Paris, France) were arbitrarily selected. Diff Quick™-stained blood film examination indicated  
121 monospecific *P. falciparum* infections with ring-stage parasitemias ranging from 0.04 to  
122 5.5%. Additional clinical information is provided for each patient in **Additional file 1: Table**  
123 **S1**.

### 124 **5WBF procedure**

125 Prior to filtration, whole blood was diluted in either PBS 1X buffer or RPMI 1640 medium  
126 (**Figure 1** and **Table 1**). For clinical samples, 50 µL and 200 µL of whole blood were diluted  
127 in 30 volumes of RPMI 1640 medium, as using small sample volumes would result in large  
128 sample loss. For mock samples, 400 µL of whole blood were diluted in ten volumes of PBS  
129 1X buffer (**Table 1**). Each diluted blood sample was then filtered using a 5 µm surfactant-free  
130 cellulose acetate syringe filter (Minisart NML® syringe filter, Sartorius reference number:  
131 17594K) connected to a 10 mL syringe (**Figure 1**). The sample was filtered by a very gentle  
132 push with the syringe plunger such that the filtrate flew drop by drop. Importantly, the plunger  
133 was pushed to the bottom of the syringe. Note that even though the filtrate passes by gravity  
134 only, using the plunger is seemingly mandatory to recover a maximum of infected RBCs. For  
135 mock samples only, the filter membrane was rinsed with another 2 mL of PBS 1X buffer  
136 (**Table 1**). The filtrate was then centrifuged at 2,500 *g* for 5 minutes at room temperature and  
137 the supernatant was discarded (**Figure 1**). One pellet volume of RPMI 1640 (clinical  
138 samples) or PBS 1X (mock samples) was added to the pelleted RBCs which were  
139 transferred to 2 mL tube and stored at 4°C until DNA extraction within the next 24 hours  
140 (**Table 1**). The filtration step itself is very quick (1 to 3 minutes), and the whole procedure  
141 takes about 20 minutes.

142 As a negative control for filtration, whole blood (400 µL) for one mock sample (parasitemia of  
143 1.1%) was subjected to the same pipeline similarly to other mock samples, except that we  
144 omitted to connect a filter at the bottom of the syringe (**Table 1**). This control mock sample is  
145 latter called M1.

### 146 **DNA extraction**

147 DNA extraction was carried out on unfiltered and 5WBF-treated samples using the  
148 MagPurix® Blood DNA Extraction Kit 200 (Biosynex, France), then eluted using the elution  
149 buffer according to the manufacturer's recommendations (**Table 1**). DNA was quantified  
150 using the Qubit® dsDNA high sensitivity kit (Thermo Fisher Scientific) according to the  
151 manufacturer's recommendations.

### 152 **sWGA procedure**

153 The sWGA method was performed on genomic DNA from unfiltered mock samples according  
154 to published protocols [9]. The sWGA reaction was performed in 0.2 mL PCR-tubes,  
155 containing 10 ng of template genomic DNA, 1× BSA (New England Biolabs), 1 mM dNTPs  
156 (New England Biolabs), 2.5 µM of each amplification primer (**Additional file 1: Table S2**), 1×  
157 Phi29 reaction buffer (New England Biolabs), 30 units of Phi29 polymerase (New England  
158 Biolabs), and molecular biology grade water to reach a final reaction volume of 50 µL. The  
159 reaction was carried out on a thermocycler with the following step-down program: 5 min at  
160 35°C, 10 min at 34°C, 15 min at 33°C, 20 min at 32°C, 30 min at 31°C, 16 h at 30°C, then

161 heating for 15 min at 65°C to inactivate the Phi29 polymerase before cooling to 4°C.  
162 Amplified products were quantified using the Qubit® dsDNA high sensitivity kit (Thermo  
163 Fisher Scientific) to determine whether there was at least 500 ng of product for sequencing.  
164 Amplified products were cleaned using Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter) as  
165 follows: 1.8 volumes of beads were added to 1 volume of amplified products, briefly mixed,  
166 and then incubated for 5 min at room temperature. A magnetic rack was used to capture the  
167 DNA binding beads. The DNA binding beads were then washed twice using 200 µL of 80%  
168 ethanol and eluted with 60 µL of EB buffer.

## 169 **Quantitative PCR**

170 The copy number of specific *P. falciparum* and human genes within the genomic DNA from  
171 clinical samples was estimated by qPCR with *Plasmodium* Typage kit (Bio-Evolution,  
172 France). Briefly, as recommended by the manufacturer, 5 µL of DNA extract was mixed with  
173 15 µL of Master Mix containing specific primers and probes targeting *P. vivax* and *P.*  
174 *falciparum* ARN 18S and human  $\beta$  *actin* genes. The reaction was carried out on a  
175 thermocycler (ViiA 7, Applied Biosystems) with the following program: 30 sec at 95°C; 40  
176 cycles: 15 sec at 95°C followed by 45 sec at 60°C; then 1 sec at 37°C. Positive and negative  
177 controls were included in each run.

## 178 **Whole-genome sequencing**

179 Genomic DNA libraries were constructed for high throughput sequencing using the KAPA  
180 hyper Prep Library Preparation Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Mechanical DNA  
181 shearing was performed with the Covaris S220 through microTube-50 AFA Fiber Screw-Cap  
182 (Covaris®) using a setting of 30% duty factor, 100W peak incidence power, and 1000 cycles  
183 per burst for 150 seconds. Then, DNA libraries were checked for quality and quantity using  
184 Qubit® for concentration and BioAnalyser 2100 Agilent for fragment size. Libraries were  
185 sequenced at 150 bp paired-end using an Illumina NextSeq 500 instrument at the  
186 GENOM'IC platform from Institut Cochin (Paris, France).

## 187 **Sequencing output analysis**

188 Sequence data obtained from each sample was subjected to standard Illumina QC  
189 procedures. Each sample was analyzed independently by mapping sequence reads to the *P.*  
190 *falciparum* 3D7 reference genome v.39 using the BWA software package [14]. Samtools  
191 (<http://samtools.sourceforge.net/>) was used to generate coverage statistics and depth  
192 estimates from the BWA mapping output. Qualimap v2.2.1 was also used to perform an  
193 analysis based on specific features derived from the alignment, including coverage, GC  
194 content and mapping quality [15]. A home-made python script was developed to calculate the  
195 percentage of each *P. falciparum* gene covered at  $\geq 10\times$  depth and the per-gene mean  
196 coverage depth ([https://github.com/Rcoppee/Scan\\_gene\\_coverage](https://github.com/Rcoppee/Scan_gene_coverage)). The script required a  
197 reference genome file in fasta format, an annotation gff file indicating the location of each  
198 exon, intron and corresponding genes, and a per-base coverage depth file generated with  
199 Bedtools genomecov function using default parameters [16]. This per-base coverage depth  
200 file was also used to plot the average read depth in 1 kb windows across the 14 *P.*  
201 *falciparum* chromosomes using the Circos software [17]. Finally, per-gene copy number was  
202 assessed using PlasmocNVScan, a custom read depth strategy specifically made for  
203 *Plasmodium* species [18].

## 204 **Ethical considerations**

205 Samples received at the French Malaria Reference Center (Paris, France) were registered  
206 and declared for research purposes as a biobank for both the Assistance Publique des  
207 Hôpitaux de Paris and Santé Publique France. The uninfected blood sample was obtained

208 from a patient having a negative malaria test. No institutional review board approval was  
209 required according to French legislation (article L. 1111-7 du Code de la Santé Publique,  
210 article L. 1211-2 du Code de Santé Publique, articles 39 et suivants de la loi 78-17 du 6  
211 janvier 1978 modifiée en 2004 relative à l'informatique, aux fichiers, et aux libertés).

212

## 213 RESULTS

### 214 Application of 5WBF to mock samples

215

216 5WBF was first applied to 400  $\mu$ L of mock blood samples (3D7 culture diluted in uninfected  
217 whole blood) with parasitemias of 1.1, 0.23 and 0.022% (each in triplicate). For the unfiltered  
218 control mock sample (sample M1; 1.1% parasitemia), 21.2% of the reads mapped to the *P.*  
219 *falciparum* genome with a mean coverage of 5.6 $\times$  depth (**Figure 2A** and **Table 2**). For the  
220 5WBF-treated mock samples ( $n = 9$ ), an average of 89.6% (standard deviation: 11.4) of the  
221 reads mapped to the *P. falciparum* genome. The proportion of *P. falciparum*-mapped reads  
222 decreased with parasitemia (**Figure 2A** and **Table 2**). Regardless, *P. falciparum* genome  
223 coverage at  $\geq 10\times$  depth was at least 98.6% whatever the parasitemia (**Figure 2B**). Reads  
224 covered both the parasite's mitochondrial and apicoplast genomes, for which mean  
225 coverages were systematically higher than 1,000 $\times$  and 59.6 $\times$  depths respectively. For  
226 comparison, one unfiltered mock sample of each parasitemia was processed by the sWGA  
227 procedure. Higher proportions of reads mapped to the *P. falciparum* genome when produced  
228 from 5WBF-treated compared to sWGA-treated samples (**Figure 2A** and **Table 2**). The  
229 difference was modest at 1.1% parasitemia but it increased as parasitemias dropped to 0.23  
230 and 0.022%. Also, reads from sWGA poorly covered the parasite mitochondrial and  
231 apicoplast genomes, systematically below a mean coverage of 10 $\times$  depth (**Table 2**). In  
232 summary almost all the bases of the different genomes of *P. falciparum* were analyzable at  $\geq$   
233 10 $\times$  depth using 400  $\mu$ L of 5WBF-treated whole blood.

234

235 We then explored two gene-level metrics: the percentage of each *P. falciparum* gene  
236 covered at  $\geq 10\times$  depth and corresponding mean coverage. For these analyses, we used two  
237 samples presenting a similar number of reads mapping to the *P. falciparum* genome (M2<sub>WGA</sub>  
238 and M2-1<sub>5F</sub>; parasitemia: 0.23%;  $\sim$ 14 million reads; **Table 2**).

239 First, for the 5WBF-treated sample, 99.0% (5,404/5,460) of nuclear genes and all organellar  
240 genes were fully covered at  $\geq 10\times$  depth, including important drug resistance genes such as  
241 *k13*, *mdr1*, *crt*, *dhfr* and *dhps* (**Figure 3A**). The few uncovered genes were mostly *rifin* and  
242 *var*. Using sWGA, 68.5% (3,741/5,460) of *P. falciparum* genes were fully covered at  $\geq 10\times$   
243 depth. None of the mitochondrial and apicoplast genes nor the drug resistance gene *mdr1*  
244 were covered at  $\geq 10\times$  depth (**Figure 3B**).

245 Second, the per-gene coverage varied little extensively with 5WBF (mean coverage: 90 $\times$ ;  
246 median: 93 $\times$ ; 5<sup>th</sup> percentile: 71 $\times$ ; 95<sup>th</sup> percentile: 103 $\times$ ) compared with the sWGA counterpart  
247 (mean coverage: 80 $\times$ ; median: 51 $\times$ ; 5<sup>th</sup> percentile: 7 $\times$ ; 95<sup>th</sup> percentile: 245 $\times$ ) (**Figure 3A** and  
248 **3B**). The coverage depth was also measured at each base across the 14 *P. falciparum*  
249 chromosomes. Reads mapped homogeneously across the genome with 5WBF, while they  
250 mapped much more heterogeneously in sWGA (**Figure 4**). Consequently, 5WBF is likely  
251 compatible with analyses based on read distribution such as identifying per-gene copy  
252 number.

253

### 254 Application of 5WBF to *P. falciparum* clinical isolates

255

256 We then tested the 5WBF procedure on *P. falciparum* clinical samples with parasitemias  
257 ranging from 0.04 to 5.5% (**Table 3**). We used 50  $\mu$ L (*i.e.* one drop) and 200  $\mu$ L of whole  
258 blood from patients to match blood volumes routinely collected in a clinical context.

259

260 First, we assessed parasite and human DNA amount by qPCR, expressed in Ct (cycle  
261 threshold), before and after 5WBF (**Additional file 1: Table S3**). Slightly higher Ct values  
262 were observed after 5WBF for the parasite qPCR assay ( $Ct_{5WBF} - Ct_{unfiltered}$ : mean = 1.1, min  
263 = -1, max = 3; n = 5 samples). In contrast, a dramatic increase in Ct values was observed  
264 after 5WBF for the human qPCR assay ( $Ct_{5WBF} - Ct_{unfiltered}$ : mean = 14, min = 10, max = 16; n  
265 = 5 samples). Accordingly, the amount of total DNA quantified by Qubit was drastically lower  
266 in the 5WBF-treated samples compared to their unfiltered counterparts (**Additional file 1:  
267 Table S3**).

268

269 With WGS data, an average of 81.4% (standard deviation: 13.0) and 94.0% (standard  
270 deviation: 4.5) of the reads mapped to the *P. falciparum* genome when 50  $\mu$ L and 200  $\mu$ L of  
271 whole blood were filtered respectively (**Figure 5A** and **Table 3**). The mean genome  
272 coverage, including organellar genomes, was systematically higher for 200  $\mu$ L than 50  $\mu$ L of  
273 whole blood (**Table 3**). However, at the 10 $\times$  depth threshold the *P. falciparum* genome  
274 coverage was similar whether using 50  $\mu$ L or 200  $\mu$ L of whole blood (average: 97%; standard  
275 deviation: 1.2; **Figure 5B**).

276

277 We then explored the two gene-level metrics as previously done for mock samples. We  
278 focused on the sample with the lowest parasitemia (0.04%), but with different volume of  
279 blood filtered (P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub>; **Table 3**). 89.7% (4,899/5,460) and 91.8% (5014/5,460) of  
280 *P. falciparum* genes were fully covered at  $\geq 10\times$  depth with P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub> respectively,  
281 including the major drug resistance genes and all organellar genes (**Figure 6**).

282 Finally, the per-gene copy number was compared for P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub>. Beforehand, all the  
283 variant surface antigens gene families (*var*, *stevor*, *rifin*, *phist* and *Plasmodium exported  
284 protein*-encoding genes) were removed to avoid any bias in the analysis (4,816 remaining  
285 genes). Similar profiles were obtained for P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub> and no gene amplification was  
286 detected (Spearman's rank correlation:  $p < 0.001$ ,  $r = 0.72$ ; **Figure 7**). Among the other  
287 samples tested, P5<sub>5F-50</sub> and P5<sub>5F-200</sub> harbored three copies of the *GTP cyclohydrolase 1* gene  
288 (*gch1*; PF3D7\_1224000) and of the four neighboring genes (PF3D7\_1223700,  
289 PF3D7\_1223800, PF3D7\_1223900 and PF3D7\_1224100; **Additional file 1: Figure S1**).  
290 The total amplicon size was 10.5 kb and resembled to the one detected in Thai isolates [19].  
291 Altogether, 50  $\mu$ L of whole blood at 0.04% parasitemia treated by 5WBF permitted to explore  
292 per-gene copy number in a clinical context.

293

## 294 DISCUSSION

295 The ability to produce high-quality sequencing data from *P. falciparum* clinical samples has  
296 valuable implications for public health. The sWGA method has massively facilitated the  
297 generation of WGS from clinical whole blood samples stored on DBS. However, sWGA-  
298 based methods present several drawbacks. Current primers used to selectively amplify the  
299 *P. falciparum* genome leads to the nearly complete loss of the mitochondrial and apicoplast  
300 genomes [9]. Furthermore, a large proportion of reads often do not map to the *P. falciparum*  
301 genome, suggesting that some contaminant human DNA remain after the sWGA step [12].  
302 Finally, reads mapping to the reference genome are not homogeneously distributed across  
303 the genome, precluding any investigation based on read distribution such as the measure of  
304 per-gene copy number [18]. Here, we demonstrate the usefulness of 5WBF, a new  
305 leucodepletion protocol based on commercial 5  $\mu$ m filters. Other filtration approaches were  
306 already successfully developed but also have their own drawbacks – whether in terms of  
307 costs, blood volumes, or standardization [7,8]. Here, we extensively used 5WBF for WGS  
308 purposes, but this strategy may likely be useful for other sequencing application such as

309 RNAseq, which often suffers from contaminant human DNA when applied to *P. falciparum*  
310 isolates and thus requiring additional costs.

311  
312 Sequencing data obtained with whole blood samples treated by 5WBF revealed that all the  
313 three *P. falciparum* genomes (nuclear, mitochondrial and apicoplast) were covered with high  
314 depth coverage. Almost all of the *P. falciparum* genes were fully covered at  $\geq 10\times$  depth,  
315 except the highly variable *var* and *rifin* gene families. Capturing the organellar genomes is  
316 especially important since they carry drug resistance genes such as *cytb* or *rps4* [20–22] or  
317 can inform on the geographic origin and evolution of the parasites [23,24]. Finally, the  
318 homogeneous distribution of reads across the genome makes it possible to detect robustly  
319 copy number variations. Such a result is very relevant since amplification of *mdr1* and  
320 *plasmepsin 2/3* modulates the resistance to multiple antimalarials [25–30].

321  
322 The 5WBF procedure was extensively tested here using the 5  $\mu\text{m}$  Minisart NML® syringe  
323 filter from the manufacturer Sartorius. Other commercially available 5  $\mu\text{m}$  might also be  
324 suitable and would need validation experiments. Financially, the cost of the 5  $\mu\text{m}$  Minisart  
325 NML® syringe filter varies from 1.0 to 1.7€ per unit depending on suppliers. This is about 10  
326 times cheaper than the Plasmodipur filter (Europroxima, Arnhem, The Netherlands, Cat.  
327 8011Filter25U [6,8]). Similarly, sWGA-based methods are more expensive than 5WBF since  
328 Phi29 DNA polymerase, primer sets and subsequent purification with Agencourt Ampure XP  
329 beads increase the cost to approximately 6–8€ per sample [9–11]. Only the leucodepletion-  
330 based method through CF11 cellulose column has a similar implementation cost [7].  
331 However, these are homemade columns, and thus requires an extended preparation time  
332 and likely lack the standardized and certified quality of commercially available filters.  
333 Altogether, the 5WBF procedure provides remarkable add-ons: simplicity and speed of the  
334 filtration procedure, standardized and ready-to-use filters, low cost per sample, and high  
335 quality of WGS data.

336  
337 The principal limitation of the 5WBF procedure is that, as for any filtration procedure, it  
338 introduces practical constraints related to centrifugation of the resulting filtrate to pellet RBCs  
339 (or decantation, if no power available as in [8]). Also, 5WBF-treated blood samples could be  
340 stored after centrifugation as DBS on filter papers, as previously done with Plasmodipur  
341 filters [8], but this needs to be tested.

342  
343 The 5WBF+WGS procedure described here was successfully tested and replicated with  
344 several *P. falciparum* blood samples exhibiting various parasitemias at the ring stage.  
345 Whether this technique works at parasitemias lower than 0.02%, with RBCs infected with  
346 more mature *P. falciparum* stages (trophozoite and schizont), and with other *Plasmodium*  
347 species needs to be rigorously tested. For example, our initial attempts on *P. ovale* clinical  
348 samples and on *in vitro* *P. falciparum* culture containing more mature asexual stages  
349 (trophozoite and schizont) indicated highly variable results regarding the capacity of these  
350 other species and stages to pass through the 5  $\mu\text{m}$  filter we used (data not shown).  
351 Considering that both the size and deformability of the host RBC vary according to the  
352 infecting *Plasmodium* species [31,32] and stage maturity, a 5  $\mu\text{m}$  filter might not be suitable  
353 for other *Plasmodium* species infecting humans.

354

355

## 356 CONCLUSION

357

358 In summary, we report a simple and cheap filtration procedure – 5WBF – that efficiently  
359 depletes human leukocytes from minute amounts of human ring-stage *P. falciparum*-infected  
360 blood. The highly enriched *P. falciparum* genomic DNA obtained is suitable for high-quality,  
361 extensive WGS and downstream analyses, including coverage of organellar genomes and  
362 detection of copy number variations.

363 **REFERENCES**

- 364 1. Ng PC, Kirkness EF. Whole genome sequencing. *Methods Mol Biol.* 2010;628:215–26.
- 365 2. Manske M, Miotto O, Campino S, Auburn S, Almagro-Garcia J, Maslen G, et al. Analysis  
366 of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature.*  
367 2012;487:375–9.
- 368 3. Amambua-Ngwa A, Amenga-Etego L, Kamau E, Amato R, Ghansah A, Golassa L, et al.  
369 Major subpopulations of *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa. *Science.*  
370 2019;365:813–6.
- 371 4. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular  
372 marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014;505:50–5.
- 373 5. MalariaGEN *Plasmodium falciparum* Community Project. Genomic epidemiology of  
374 artemisinin resistant malaria. *Elife.* 2016;5.
- 375 6. Auburn S, Campino S, Clark TG, Djimde AA, Zongo I, Pinches R, et al. An effective  
376 method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for whole  
377 genome high-throughput sequencing. *PLoS One.* 2011;6:e22213.
- 378 7. Venkatesan M, Amaratunga C, Campino S, Auburn S, Koch O, Lim P, et al. Using CF11  
379 cellulose columns to inexpensively and effectively remove human DNA from *Plasmodium*  
380 *falciparum*-infected whole blood samples. *Malar J.* 2012;11:41.
- 381 8. Nag S, Kofoed P-E, Ursing J, Lemvigh CK, Allesøe RL, Rodrigues A, et al. Direct whole-  
382 genome sequencing of *Plasmodium falciparum* specimens from dried erythrocyte spots.  
383 *Malar J.* 2018;17:91.
- 384 9. Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, Kekre M, Amenga-Etego LN, Ghansah A, et al. Whole  
385 genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole  
386 genome amplification. *Malar J.* 2016;15:597.
- 387 10. Shah Z, Adams M, Moser KA, Shrestha B, Stucke EM, Laufer MK, et al. Optimization of  
388 parasite DNA enrichment approaches to generate whole genome sequencing data for  
389 *Plasmodium falciparum* from low parasitaemia samples. *Malar J.* 2020;19:135.
- 390 11. Teyssier NB, Chen A, Duarte EM, Sit R, Greenhouse B, Tessema SK. Optimization of  
391 whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from low-density dried blood spot  
392 samples. *Malar J.* 2021;20:116.
- 393 12. Guggisberg AM, Sundararaman SA, Lanaspá M, Moraleda C, González R, Mayor A, et  
394 al. Whole-Genome Sequencing to Evaluate the Resistance Landscape Following  
395 Antimalarial Treatment Failure With Fosmidomycin-Clindamycin. *J Infect Dis.*  
396 2016;214:1085–91.
- 397 13. Namvar A, Blanch AJ, Dixon MW, Carmo OMS, Liu B, Tiash S, et al. Surface area-to-  
398 volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal  
399 through small channels. *Cell Microbiol.* 2021;23:e13270.
- 400 14. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.  
401 *Bioinformatics.* 2009;25:1754–60.
- 402 15. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample  
403 quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2016;32:292–4.

- 404 16. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic  
405 features. *Bioinformatics*. 2010;26:841–2.
- 406 17. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: an  
407 information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009;19:1639–45.
- 408 18. Beghain J, Langlois A-C, Legrand E, Grange L, Khim N, Witkowski B, et al. Plasmodium  
409 copy number variation scan: gene copy numbers evaluation in haploid genomes. *Malar J*.  
410 2016;15:206.
- 411 19. Nair S, Miller B, Barends M, Jaidee A, Patel J, Mayxay M, et al. Adaptive copy number  
412 evolution in malaria parasites. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000243.
- 413 20. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in  
414 Plasmodium falciparum cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are  
415 located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2100–8.
- 416 21. Cottrell G, Musset L, Hubert V, Le Bras J, Clain J, Atovaquone-Proguanil Treatment  
417 Failure Study Group. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites:  
418 insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents*  
419 *Chemother*. 2014;58:4504–14.
- 420 22. Blasco B, Leroy D, Fidock DA. Antimalarial drug resistance: linking Plasmodium  
421 falciparum parasite biology to the clinic. *Nat Med*. 2017;23:917–28.
- 422 23. Preston MD, Campino S, Assefa SA, Echeverry DF, Ocholla H, Amambua-Ngwa A, et al.  
423 A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of  
424 Plasmodium falciparum strains. *Nat Commun*. 2014;5:4052.
- 425 24. Ibrahim A, Diez Benavente E, Nolder D, Proux S, Higgins M, Muwanguzi J, et al.  
426 Selective whole genome amplification of Plasmodium malariae DNA from clinical samples  
427 reveals insights into population structure. *Sci Rep*. 2020;10:10832.
- 428 25. Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in  
429 Plasmodium falciparum is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to  
430 halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:1143–7.
- 431 26. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner SF, Mukherjee A, Lim P, et al. Plasmepsin II-  
432 III copy number accounts for bimodal piperazine resistance among Cambodian  
433 Plasmodium falciparum. *Nat Commun*. 2018;9:1769.
- 434 27. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al.  
435 Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number.  
436 *Lancet*. 2004;364:438–47.
- 437 28. Sidhu ABS, Uhlemann A-C, Valderramos SG, Valderramos J-C, Krishna S, Fidock DA.  
438 Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility  
439 to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*.  
440 2006;194:528–35.
- 441 29. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers  
442 associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in Plasmodium falciparum malaria in  
443 Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:164–73.

- 444 30. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate  
445 marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype  
446 association study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:174–83.
- 447 31. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The  
448 deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Infect*  
449 *Dis*. 2004;189:190–4.
- 450 32. Karimi A, Navidbakhsh M, Haghi AM, Faghihi S. A morphology-based method for the  
451 diagnosis of red blood cells parasitized by *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*.  
452 *Scand J Infect Dis*. 2014;46:368–75.

453

#### 454 **LIST OF ABBREVIATIONS**

455 5WBF: 5 µm Whole Blood Filtration  
456 Ct: Cycle threshold  
457 DBS: Dried blood spots  
458 RBCs: Red blood cells  
459 sWGA: Selective whole-genome amplification  
460 WGS: Whole-genome sequencing

461

462

#### 463 **DECLARATION**

##### 464 **Ethics approval**

465 No institutional review board approval was required according to French legislation (article L.  
466 1111-7 du Code de la Santé Publique, article L. 1211-2 du Code de Santé Publique, articles  
467 39 et suivants de la loi 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée en 2004 relative à l'informatique,  
468 aux fichiers, et aux libertés). Samples received at the French Malaria Reference Center,  
469 (Paris, France) were registered and declared for research purposes as a biobank for both the  
470 Assistance Publique des Hôpitaux de Paris and Santé Publique France.

##### 471 **Consent for publication**

472 There are no case presentations that require disclosure of respondent's confidential  
473 data/information in this study.

##### 474 **Availability of data and materials**

475 The script used to calculate the percentage of each *P. falciparum* gene covered at  $\geq 10\times$   
476 depth and the per-gene mean coverage depth was deposited on github:  
477 [https://github.com/Rcoppee/Scan\\_gene\\_coverage](https://github.com/Rcoppee/Scan_gene_coverage). The datasets analyzed in the study are  
478 available from the corresponding authors on request.

##### 479 **Competing interests**

480 The authors declare that they have no competing interests.

##### 481 **Funding**

482 This work was partly supported by Santé Publique France (to S.H.), the Agence Nationale de  
483 la Recherche (ANR-17-CE15-0013-03 to J.C.).

##### 484 **Author's contributions**

485 RC, FA, SH, and JC conceived and coordinated the study. AM, VS, CK, and LP performed  
486 the filtrations. RC performed sWGA. SH and VS participated in sample collection. LA and FL  
487 performed next-generation sequencing. RC performed data analyses and script production.  
488 RC drafted the manuscript. RC, AM, VS, CK, FA, SH and JC participated in the editing and  
489 final preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

490 **TABLES**

491

492 **Table 1 – Details of samples subjected to WGS.**

Origin	Sample	Enrichment method	% par. <sup>a</sup>	Blood volume (μL)	Blood:buffer dilution	Washing filter membrane <sup>b</sup>	Volume of DNA elution buffer (μL)
<b>Mock (3D7)</b>	M1	none	1.10	400	1:10, PBS 1X	n.a.	200
	M1 <sub>WGA</sub>	sWGA	1.10	400	1:10, PBS 1X	n.a.	200
	M1-1 <sub>5F</sub>	5WBF	1.10	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M1-2 <sub>5F</sub>	5WBF	1.10	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M1-3 <sub>5F</sub>	5WBF	1.10	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M2 <sub>WGA</sub>	sWGA	0.23	400	1:10, PBS 1X	n.a.	200
	M2-1 <sub>5F</sub>	5WBF	0.23	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M2-2 <sub>5F</sub>	5WBF	0.23	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M2-3 <sub>5F</sub>	5WBF	0.23	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M3 <sub>WGA</sub>	sWGA	0.022	400	1:10, PBS 1X	n.a.	200
	M3-1 <sub>5F</sub>	5WBF	0.022	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M3-2 <sub>5F</sub>	5WBF	0.022	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
	M3-3 <sub>5F</sub>	5WBF	0.022	400	1:10, PBS 1X	2 mL PBS 1X	200
<b>Patients</b>	P1 <sub>5F-50</sub>	5WBF	0.04	50	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P1 <sub>5F-200</sub>	5WBF	0.04	200	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P2 <sub>5F-50</sub>	5WBF	0.08	50	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P2 <sub>5F-200</sub>	5WBF	0.08	200	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P3 <sub>5F-50</sub>	5WBF	0.25	50	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P3 <sub>5F-200</sub>	5WBF	0.25	200	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P4 <sub>5F-50</sub>	5WBF	0.40	50	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P4 <sub>5F-200</sub>	5WBF	0.40	200	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P5 <sub>5F-50</sub>	5WBF	5.50	50	1:30, RPMI 1640	n.d.	200
	P5 <sub>5F-200</sub>	5WBF	5.50	200	1:30, RPMI 1640	n.d.	200

493

494 Note – <sup>a</sup> % par., parasitemia in percentage; <sup>b</sup> n.a., not applicable; n.d., not done

495 **Table 2 – WGS statistics of *P. falciparum* DNA extracted from mock samples subjected to either no**  
 496 **treatment or sWGA or 5WBF.**

Sample name	% par. <sup>a</sup>	Enrichment method	Total reads	<i>P. falciparum</i> -mapped reads (%)	Mean genome coverage (X)	Mean coverage of mt genome (X) <sup>b</sup>	Mean coverage of api genome (X) <sup>c</sup>
M1	1.1	None	14,777,245	3,135,321 (21.22)	5.6	45.39	11.76
M1 <sub>WGA</sub>	1.1	sWGA	16,002,711	15,347,302 (95.9)	74.4	5.20	8.44
M1-1 <sub>5F</sub>	1.1	5WBF	19,932,109	19,558,272 (98.12)	104.8	2102.17	216.15
M1-2 <sub>5F</sub>	1.1	5WBF	16,923,729	16,591,158 (98.03)	89.59	1701.08	183.29
M1-3 <sub>5F</sub>	1.1	5WBF	17,230,853	17,018,367 (98.77)	90.04	1335.70	150.66
M2 <sub>WGA</sub>	0.23	sWGA	16,266,710	14,112,713 (86.76)	69.16	1.59	3.57
M2-1 <sub>5F</sub>	0.23	5WBF	14,905,078	14,350,236 (96.28)	79.71	1468.76	120.40
M2-2 <sub>5F</sub>	0.23	5WBF	19,310,196	18,169,487 (94.09)	99.82	1782.77	161.75
M2-3 <sub>5F</sub>	0.23	5WBF	17,672,315	16,766,350 (94.87)	91.15	1933.32	129.47
M3 <sub>WGA</sub>	0.022	sWGA	9,840,798	4,915,197 (49.95)	18.63	0.31	2.34
M3-1 <sub>5F</sub>	0.022	5WBF	17,283,136	14,467,900 (83.71)	76.72	1209.77	115.57
M3-2 <sub>5F</sub>	0.022	5WBF	17,759,091	11,975,821 (67.43)	62.32	1528.46	98.56
M3-3 <sub>5F</sub>	0.022	5WBF	13,052,530	9,839,100 (75.38)	52.17	1026.41	59.63

497 Note – Reads were mapped to the *P. falciparum* 3D7 reference genome v.39. <sup>a</sup>% par., parasitemia in percentage;  
 498 <sup>b</sup> mt, mitochondrial; <sup>c</sup> api, apicoplast.

499 **Table 3 – 5WBF-based WGS statistics from five *P. falciparum* clinical isolates.**

Patient	% par. <sup>a</sup>	Sample name	Volume of blood filtered (μL)	Total reads	<i>P. falciparum</i> -mapped reads (%)	Mean genome coverage (X)	Mean coverage of mt genome (X) <sup>b</sup>	Mean coverage of api genome (X) <sup>c</sup>
1	0.04	P1 <sub>5F-50</sub>	50	12,179,133	9,487,373 (77.90)	49.97	664.63	38.04
		P1 <sub>5F-200</sub>	200	11,913,069	11,363,989 (95.39)	60.43	910.04	45.12
2	0.08	P2 <sub>5F-50</sub>	50	11,305,296	7,949,064 (70.31)	40.96	534.58	53.71
		P2 <sub>5F-200</sub>	200	10,668,907	9,273,820 (86.92)	49.09	807.60	61.40
3	0.25	P3 <sub>5F-50</sub>	50	11,727,334	10,693,769 (91.19)	59.79	490.97	48.93
		P3 <sub>5F-200</sub>	200	15,203,526	14,512,154 (95.45)	77.68	628.79	80.60
4	0.40	P4 <sub>5F-50</sub>	50	12,500,393	8,627,931 (69.02)	44.39	449.46	79.74
		P4 <sub>5F-200</sub>	200	13,886,282	12,952,939 (93.28)	68.77	779.27	106.35
5	5.50	P5 <sub>5F-50</sub>	50	22,830,831	22,459,337 (98.37)	117.53	1219.30	240.98
		P5 <sub>5F-200</sub>	200	28,206,251	27,924,816 (99.00)	147.98	1483.73	357.97

500 <sup>a</sup>, % para, parasitemia in percentages; <sup>b</sup>, mit, mitochondrial; <sup>c</sup>, api, apicoplast.

## 501 FIGURE LEGENDS

502 **Figure 1 – Main steps of 5WBF.** (1) 50 to 400  $\mu\text{L}$  of whole blood were diluted in RPMI 1640  
503 medium or PBS 1X buffer in either (a) a 15 mL tube or (b) a larger flask. The cartoon shows  
504 200  $\mu\text{L}$  of whole blood diluted in RPMI 1640 as an example. (2) The diluted sample was  
505 loaded onto a 10 mL syringe either after (a) or before (b) the 5  $\mu\text{m}$  filter was connected to the  
506 syringe. (3) The blood was filtered by very gentle pressure with the syringe plunger. The  
507 pressure was applied until the plunger reached the bottom of the syringe to recover the  
508 maximum of infected RBCs. The filtration step itself is rapid and takes about 1 to 3 minutes.  
509 (4) The filtrate was centrifuged at 2,500  $g$  for 5 minutes and the supernatant was discarded.  
510 The pellet was suspended with  $\sim$  one volume of RPMI 1640 or PBS 1X, transferred into a 1.5  
511 mL tube, and stored until DNA extraction. Important notes: *i*) from our own experiments, we  
512 estimated that the filter dead volume was about 200  $\mu\text{L}$  (reported as 100-150  $\mu\text{L}$  by the  
513 manufacturer); *ii*) even after the 2 mL optional wash, the filter had a red color indicating some  
514 retained RBCs or hemolysis during filtration; RBCs loss seems low although we have not  
515 precisely quantified it; *iii*) the harder the push with the syringe plunger, the more hemolysis  
516 occurs; and *iv*) the WGS data presented in this study were obtained using the (2b) version of  
517 the protocol; similar high-quality WGS data were obtained when using the (2a) version (data  
518 not shown).

519 **Figure 2 – Proportions of mapped reads and *P. falciparum* genome coverage from**  
520 **mock whole blood samples.** (a) Proportion of reads mapping to the *P. falciparum* nuclear  
521 and organellar genomes. Red and black colors indicate the proportion of reads mapping and  
522 not mapping to the *P. falciparum* genomes respectively. (b) Genome fraction coverage from  
523 1 $\times$  to 50 $\times$  depth. Data from sWGA- and 5WBF-treated samples are indicated in dashed and  
524 solid lines respectively. Three independent 5WBF blood filtration replicates were made.

525 **Figure 3 – Comparison of gene coverage depth between M2<sub>WGA</sub> and M2-1<sub>5F</sub> mock**  
526 **samples.** (a) Coverage depth of all genes for M2-1<sub>5F</sub>. Gene distribution based on the  
527 percentage of gene covered at  $\geq 10\times$  depth. Each blue point corresponds to a gene.  
528 Mitochondrial genes were discarded for ease of representation. The *insert* table indicates the  
529 mean coverage and the percentage of genes covered at  $\geq 10\times$  for five drug resistance  
530 genes. Descriptive statistics on the right of the figure included the number of genes, the  
531 number of genes fully covered at  $\geq 10\times$ , the mean and median coverage of all genes, and the  
532 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles of coverage depth. Genes were partitioned as of either nuclear,  
533 mitochondrial, or apicoplast origins. (b) Coverage depth of all genes for M2<sub>WGA</sub>. Description  
534 of the plot and the tables are the same as in (a).

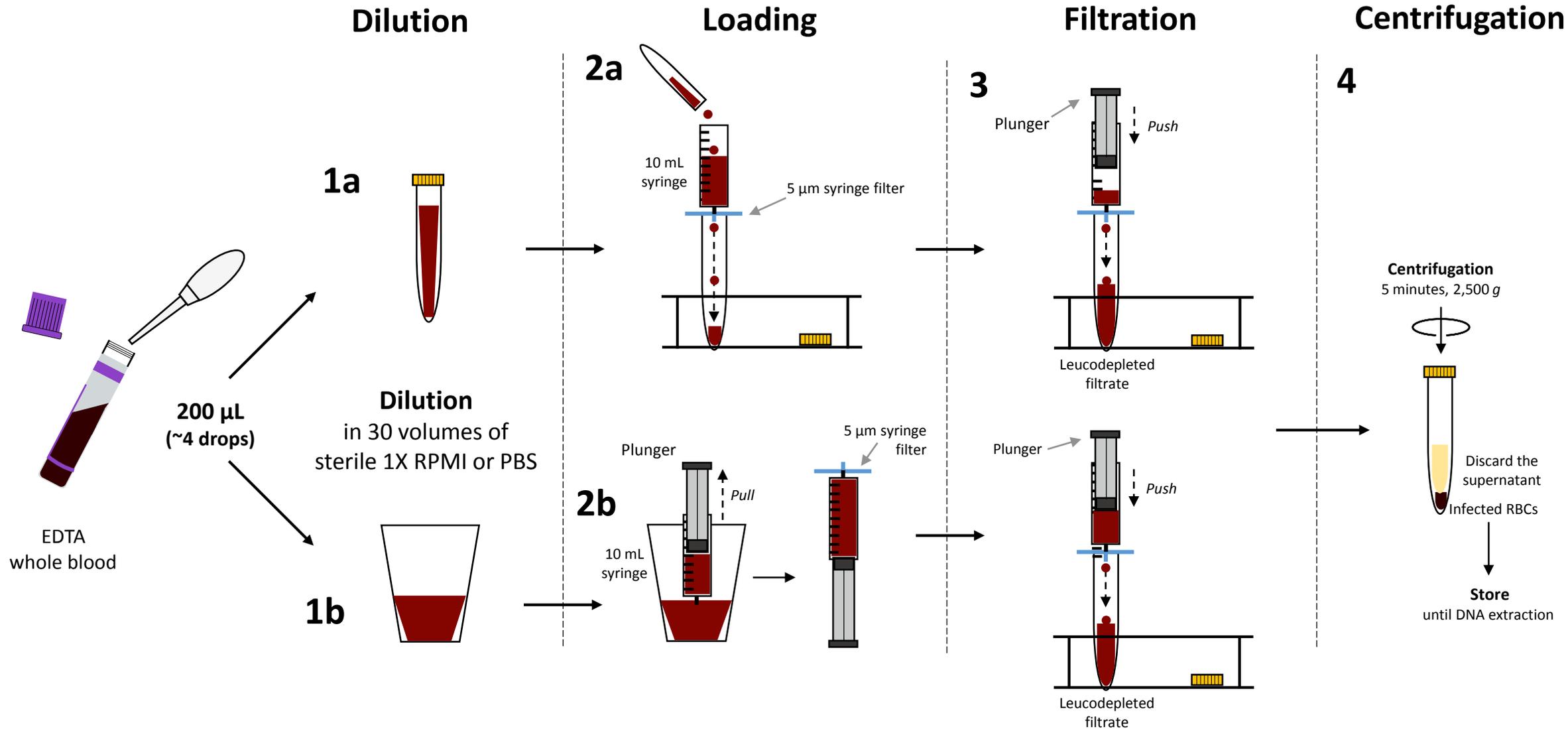
535 **Figure 4 – Distribution of the reads along the 14 *P. falciparum* chromosome for M2-1<sub>5F</sub>**  
536 **and M2<sub>WGA</sub> mock samples.** The three rings represent, from outermost to innermost, the 14  
537 *P. falciparum* chromosomes (illustrated to scale in kb), and the average read depth in 1 kb  
538 windows for M2-1<sub>5F</sub> and for M2<sub>WGA</sub>, respectively. For ease of representation, the maximum  
539 depth for M2-1<sub>5F</sub> and M2<sub>WGA</sub> was fixed at 200 $\times$  and 500 $\times$  respectively.

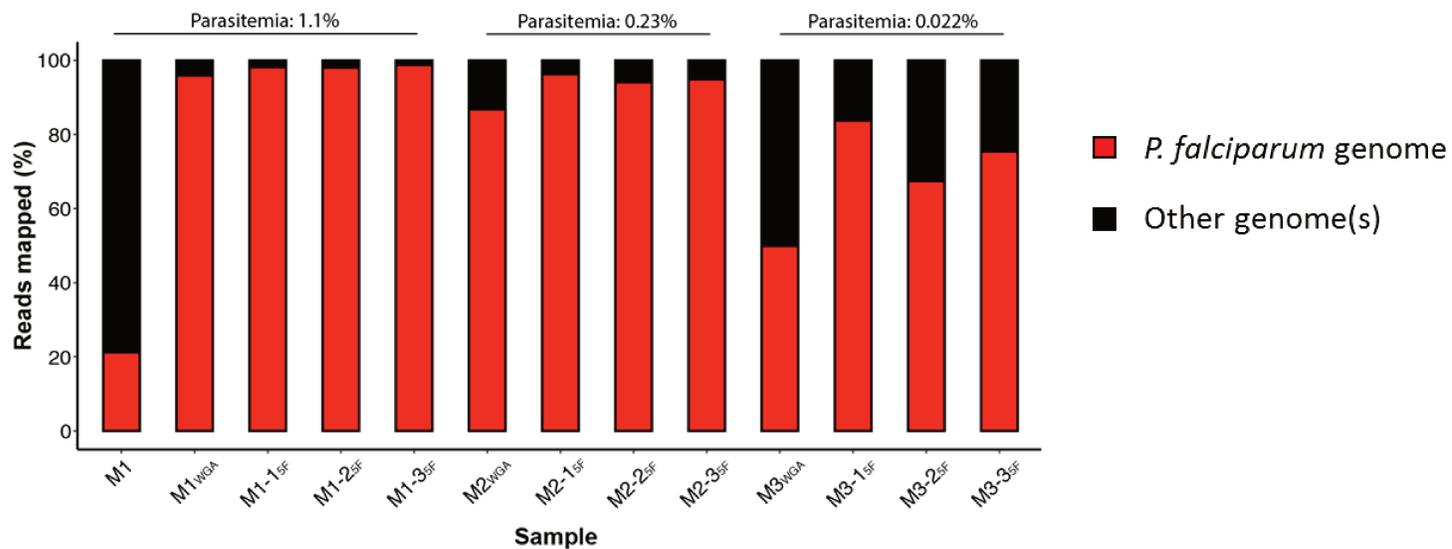
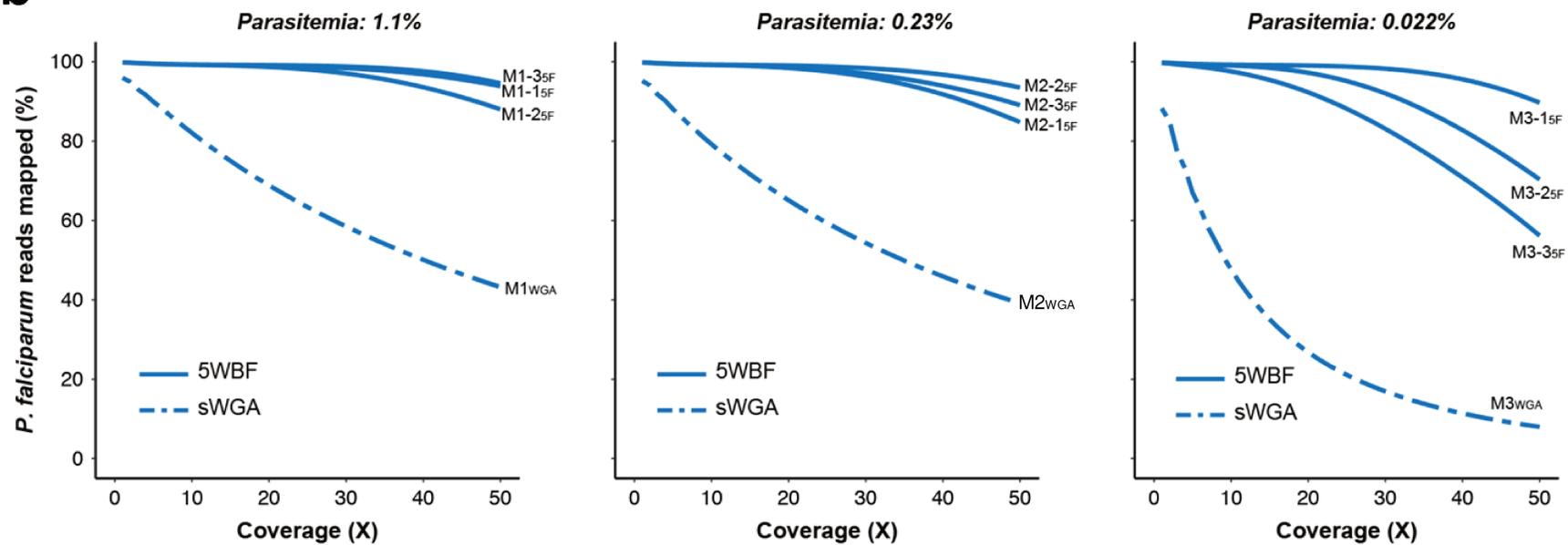
540 **Figure 5 – Proportions of mapped reads and *P. falciparum* genome coverage from**  
541 **clinical samples.** (a) Proportion of reads mapping to the *P. falciparum* nuclear and  
542 organellar genomes. Red and black colors respectively indicate the proportion of reads  
543 mapping and not mapping to the *P. falciparum* genomes. (b) Genome fraction coverage from  
544 1 $\times$  to 50 $\times$  depth. Data from 50  $\mu\text{L}$  and 200  $\mu\text{L}$  of filtered whole blood are indicated in solid  
545 and dashed lines respectively.

546 **Figure 6 – Comparison of gene coverage depth between P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub> 5WBF-**  
547 **treated clinical samples.** (a) Coverage depth of all genes for P1<sub>5F-50</sub>. Gene distribution  
548 based on the percentage of gene covered at  $\geq 10\times$  depth. Each blue point corresponds to a  
549 gene. Mitochondrial genes were discarded for ease of representation. The *insert* table

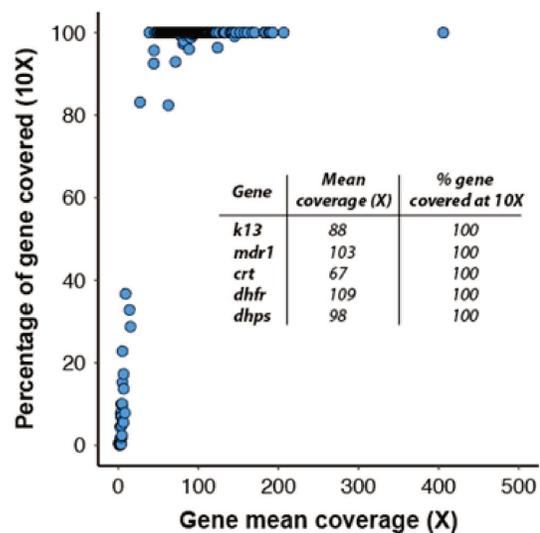
550 indicates the mean coverage and the percentage of gene covered at  $\geq 10\times$  of five drug  
551 resistance genes. Descriptive statistics included the total number of *P. falciparum* (3D7)  
552 genes, the number of genes fully covered at  $\geq 10\times$ , the mean and median coverage of all  
553 genes, and the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles of depth coverage. Genes were partitioned as of  
554 either nuclear, mitochondrial, or apicoplast origins. (b) Coverage depth of all genes for P1<sub>5F-</sub>  
555 200. Description of the plot and the tables are the same as in (a).

556 **Figure 7 – Estimation of per-gene copy number for P1<sub>5F-50</sub> and P1<sub>5F-200</sub> clinical samples**  
557 **using PlasmocNVScan.** Each point corresponds to a gene. A value  $< 0.5$  suggests a gene  
558 deletion, while a value  $> 1.5$  suggests a gene amplification. Values between 0.5 and 1.5 are  
559 supposed to be single gene copy. A positive correlation was observed between the two  
560 samples (Spearman's rank correlation:  $p < 0.001$ ,  $r = 0.72$ ).



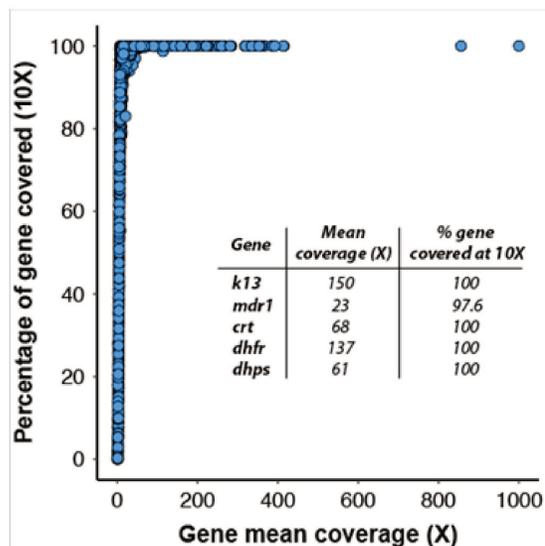
**a****b**

**a** 5WBF method (sample M2-15F)

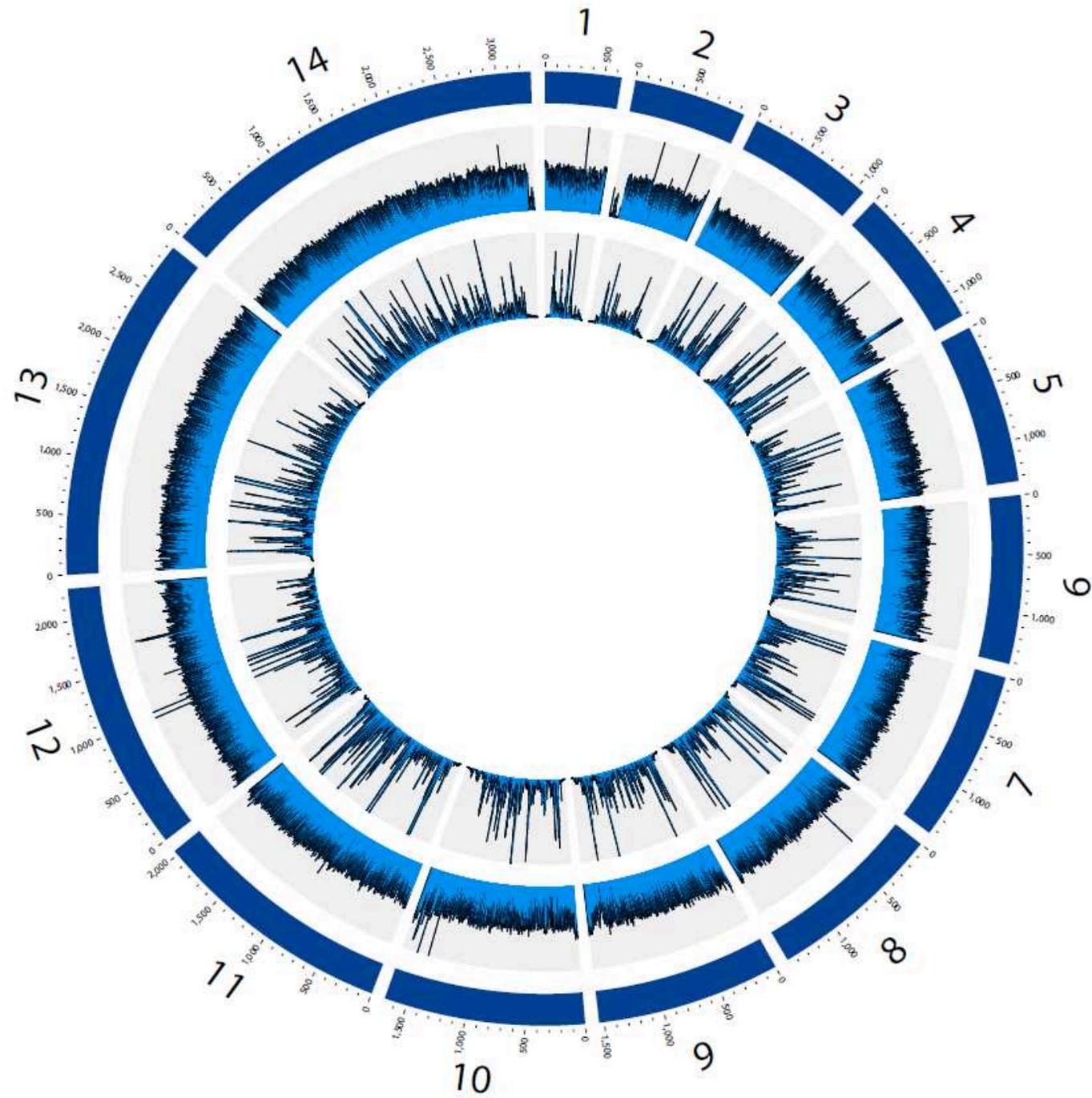


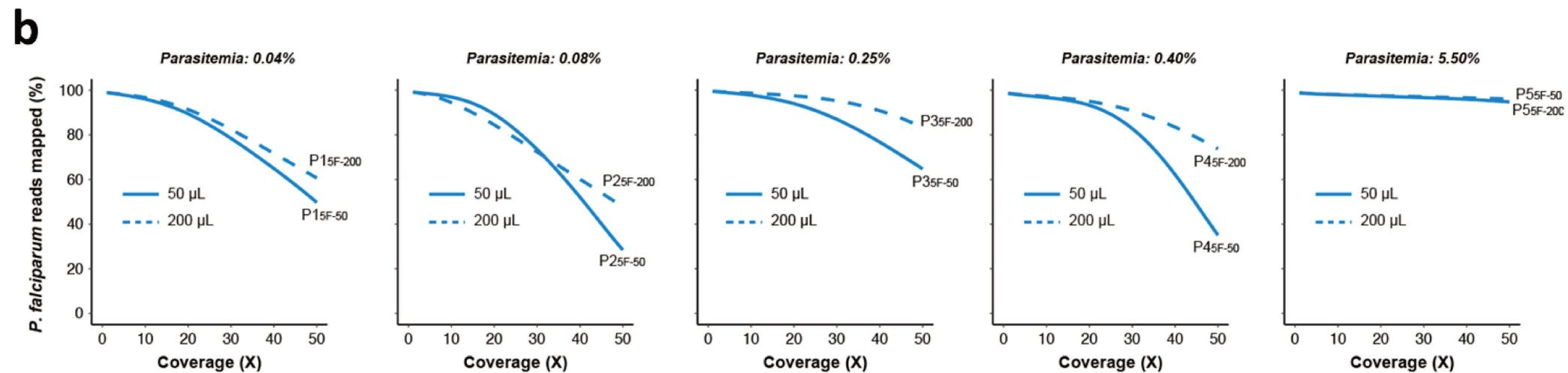
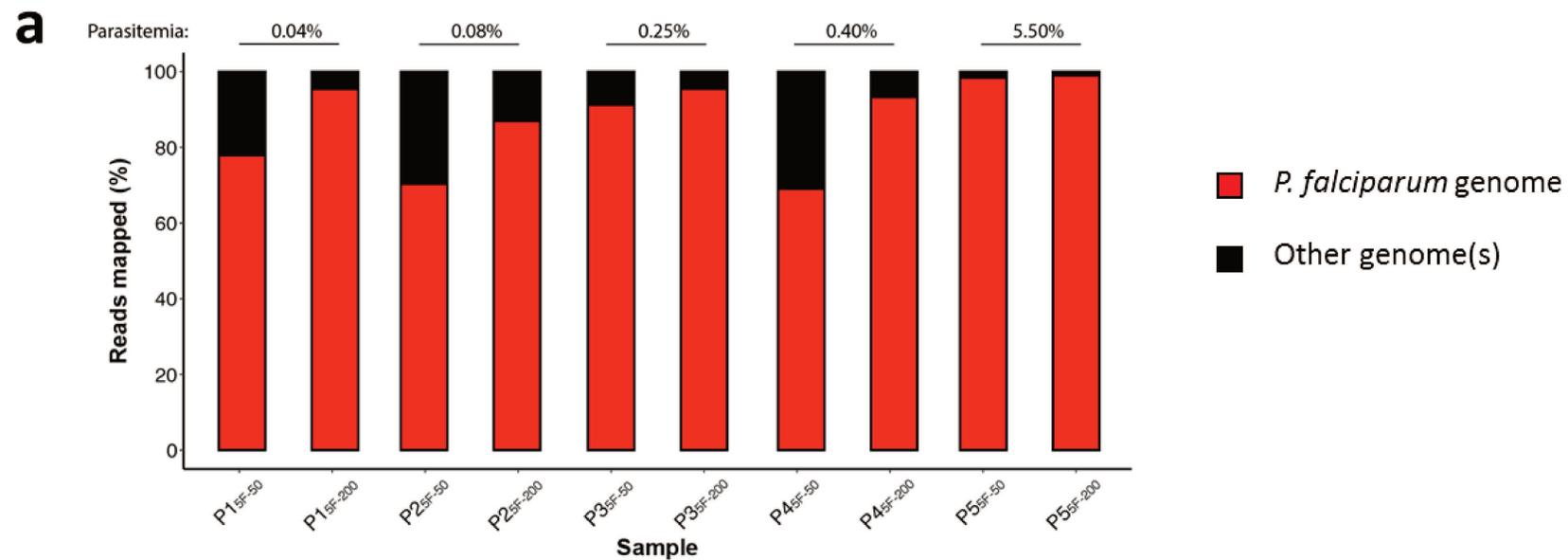
	Nuclear	Mitochondrion	Apicoplast	Whole genomes
Number of genes	5,427	3	30	5,460
Number of genes fully covered at 10X	5,371	3	30	5,404
Mean coverage of genes (X)	90	1,535	107	91
Median coverage of genes (X)	93	1,535	99	93
5th percentile coverage (X)	71	1,517	57	70
95th percentile coverage (X)	103	1,553	165	103

**b** sWGA method (sample M2<sub>WGA</sub>)

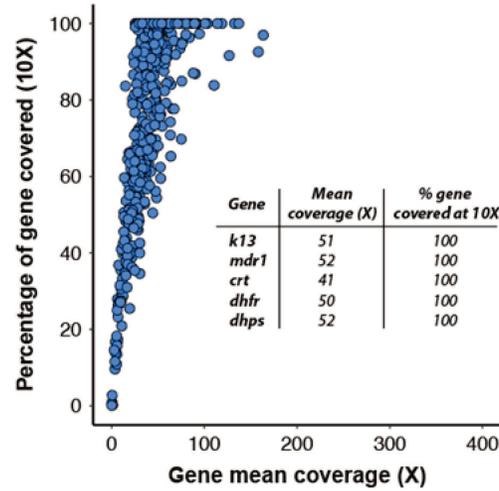


	Nuclear	Mitochondrion	Apicoplast	Whole genomes
Number of genes	5,427	3	30	5,460
Number of genes fully covered at 10X	3,741	0	0	3,741
Mean coverage of genes (X)	80	2	3	80
Median coverage of genes (X)	51	2	3	51
5th percentile coverage (X)	7	1	1	7
95th percentile coverage (X)	245	3	8	245



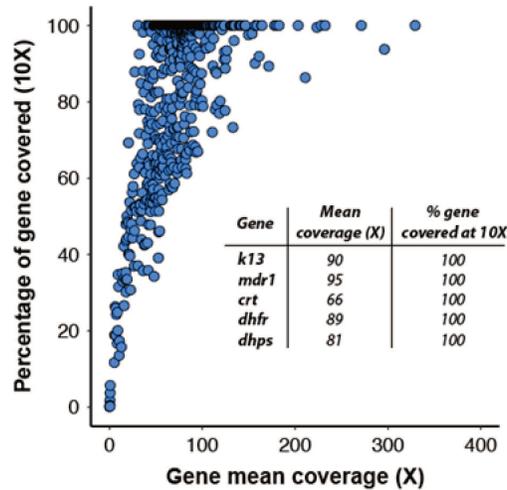


**a** 5WBF method (sample P15F-50, 50  $\mu$ L of whole blood)

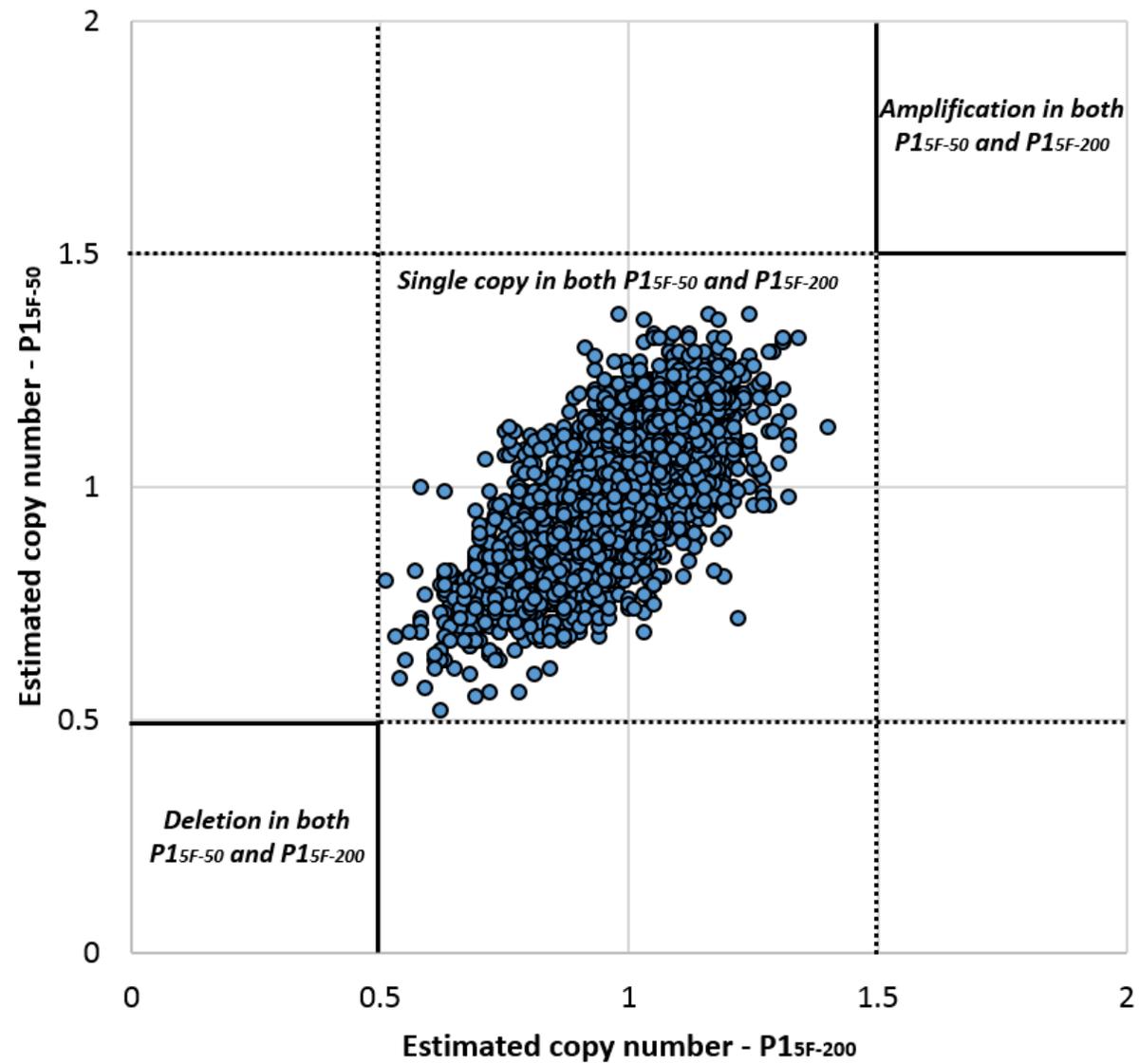


	Nuclear	Mitochondrion	Apicoplast	Whole genomes
Number of genes	5,427	3	30	5,460
Number of genes fully covered at 10X	4,867	3	30	4,900
Mean coverage of genes (X)	47	485	77	48
Median coverage of genes (X)	49	486	78	49
5th percentile coverage (X)	34	478	62	34
95th percentile coverage (X)	55	492	88	56

**b** 5WBF method (sample P15F-200, 200  $\mu$ L of whole blood)



	Nuclear	Mitochondrion	Apicoplast	Whole genomes
Number of genes	5,427	3	30	5,460
Number of genes fully covered at 10X	4,982	3	30	5,015
Mean coverage of genes (X)	79	786	91	80
Median coverage of genes (X)	81	794	88	81
5th percentile coverage (X)	57	770	49	57
95th percentile coverage (X)	93	796	141	93



### **ARTICLE 3: Dynamics of *Plasmodium falciparum* genome during artemisinin treatment: evidence from *ex vivo* study**

#### **Objectifs de l'étude :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact des dérivés d'artémisinine sur la dynamique du génome des populations parasitaires à *P. falciparum* au cours des premières heures de traitement.

#### **Résultats clés :**

Les isolats utilisés au cours de cette étude ont été collectés à J0 avant traitement et à J1 18 heures après traitement chez des enfants âgés de moins de cinq ans souffrant de paludisme simple et de paludisme grave. Deux techniques de séquençage nouvelles générations (WGS et TADs), nous ont permis d'atteindre cet objectif.

La technique de séquence du génome entier (WGS) nous a permis d'explorer l'ensemble du génome de nos parasites et a montré que les isolats à J0 et J1 étaient similaires à l'exception de deux couples chez lesquels, on a observé une grande diversité génétique. De plus, nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence entre les parasites de patients souffrant de paludisme simple ou de paludisme grave d'une part, mais aussi qu'aucune différence n'était observé d'un site à un autre.

La technique du TADs quant à elle, nous a permis de montrer la présence de deux types de populations : une population parasitaire majoritaire et une autre minoritaire avec des parasites émergents. Le génotypage de *pfk13* dans la population majoritaire a montré deux mutations (une non-synonyme et une synonyme) tandis que dans la population minoritaire, nous avons observé 27 mutations dont 15 émergents. Parmi ces quinze mutations, deux (M476I et P443S) sont connues pour être associées à la résistance à l'artémisinine.

Dans cette étude, nous avons également pu montrer que le traitement à l'artémisinine avait un impact sur le taux de mutation de *pfk13* car ce taux était plus élevé comparé à celui de *pfdhfr* qui est notre contrôle. De plus, nous avons observé une différence significative entre le taux de mutation à J0 avant traitement et le taux de mutation à J1 pour *pfk13* ( $p=0.015$ ).

## **Limites de l'étude**

Notre étude présente certaines limites. Nous pensons que la clonalité des échantillons pourrait avoir un impact sur nos résultats. L'optimisation de notre méthode d'analyse en cours nécessite la prise en compte de ce paramètre.

C'est la première fois qu'une étude de ce genre a été mise en place, il nous semble donc important de confirmer les résultats sur les mutations observés sur populations parasitaires minoritaires par la digitale PCR.

Dans cette étude, nous avons observé un taux de mutation élevé du gène *pfk13*. Nous pensons que ce taux doit être confirmé par rapport à tous les gènes de *P.falciparum* mais aussi par rapport à des isolats provenant d'autres environnements (milieux non endémiques au paludisme, zone où les décoctions à base d'artémisinine ne sont pas utilisées par exemple).

**Dynamics of *Plasmodium falciparum* genome during artemisinin treatment:  
evidence from *ex vivo* study**

Atikatou Mama<sup>1</sup>, Romain Coppée<sup>1</sup>, Benjamin Bourgeois<sup>2</sup>, Brigitte Izaac<sup>2</sup>, Franck Letourneur<sup>2</sup>, Lucie Adoux<sup>2</sup>, Azizath Moussiliou<sup>3</sup>, Rachida , Tahar<sup>1</sup>, Jérôme Clain<sup>1</sup> , Nicaise Tuikue Ndam<sup>1</sup>, Frédéric Ariey<sup>4, ‡</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France.

<sup>2</sup> Université de Paris, INSERM 1016, Plateforme de GENOM'IC, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France.

<sup>3</sup> Université de Parakou, Bénin

<sup>4</sup> Université de Paris, INSERM 1016, Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France.

‡ Correspondence and requests should be addressed to Frédéric Ariey (email: frederic.ariey@inserm.fr)

## Abstract

Artemisinin derivatives are currently the only drugs used as first-line treatment for malaria. However, these drugs are threatened by the emergence of mutations associated with artemisinin resistance in South East Asia and East Africa. It is therefore vital to strengthen the monitoring of the emergence and spread of this resistance through the use of tools for early detection of mutations in minority populations. In the present study, we proposed to study the impact of artemisinin-based treatments on the dynamic of *P.falciparum* genome few hours after treatment.

Blood samples were collected in two communities (Cotonou and Ouidah) at D0 (before treatment) and D1 (18 hours after treatment) from thirty children under five years suffering from uncomplicated and complicated malaria. These children were treated with artemether-lumefantrine for those with uncomplicated malaria and artesunate for those with complicated malaria. Samples blood was filtered and whole genome sequencing (WGS) and TADs were performed. Sequences obtained were compared between D0 and D1 in the major and minor parasites populations.

The analysis showed that samples were similar between D0 and D1 except for two isolates. No differences was observed based on study sites or the severity of the disease. The analysis of *pfk13* in the majority allele showed two mutations (one nonsynonymous and the other synonymous) while that of minority allele showed twenty-seven mutations with fifteen emerging minority alleles. Out of them, two mutations (M476I and P443S) were known to be associated with artemisinine resistance. We also showed that artemisinin treatment had an impact on *pfk13* mutation rate of. The mutation rate of *pfk13* was higher than that of *pfdhfr* and between D0 and D1 there is a significant difference for *pfk13* ( $p=0.015$ ),

This study demonstrates that intra host selection of parasites carrying mutation during artemisinin derivatives treatment is frequent. Therefore, efficacy of partner drug is of paramount importance to sustain long term ACTs efficacy.

**Keywords** *Plasmodium falciparum*, targeted next-generation sequencing, artemisinin resistance, *pfk13*, *pfdhfr*

## Introduction

Malaria is a parasitic disease caused by the *Plasmodium* genus, with *P. falciparum* parasite responsible for most cases and severe forms<sup>1,2</sup>. Over the past 15 years, considerable progresses have been made in the fight against malaria, leading to a 60% reduction in deaths worldwide<sup>3</sup>. This significant reduction is mainly attributed to the massive distribution of insecticide-treated nets, the indoor residual spraying, the use of rapid diagnostic tests and curative artemisinin-based combination therapies (ACTs), and the deployment of intermittent preventive treatment (IPT) for at-risk populations such as pregnant women and children under five years old<sup>1,4,5</sup>.

From the 2000s onwards in Benin, drug policy for malaria treatment has changed from chloroquine (CQ) to sulfadoxine-pyrimethamine (SP), then to ACTs. However, the long-term use of ACTs is now compromised by the emergence of *P. falciparum* parasites that are resistant to artemisinin derivatives in Uganda and Rwanda (East Africa), where non-synonymous mutation in the *P. falciparum kelch13 (pfk13)* gene have been found<sup>6-8</sup>. Today, ACTs are the most widely used drugs, and the spontaneous emergence of non-synonymous mutations associated with artemisinin resistance documented in East Africa, raises concerns about the spread of artemisinin resistance to other parts of Africa and/or the emergence of other resistance hot spots. It is therefore important to implement sensitive surveillance tools in national malaria control programs (NMCPs) to identify areas at risk of artemisinin resistance emergence in Africa.

Over the past three decades, molecular surveillance had heavily relied on Sanger genotyping methods to generate data and map the resistance status of parasites to different antimalarial drugs. The recent use of Whole Genome Sequencing (WGS) can precisely describe parasite population structures<sup>9</sup> but is not valuable for identification of parasite subpopulation selection because depth of sequencing is generally under 100x. On the opposite, targeted amplicon deep sequencing is a fairly recent method that allows comprehensive searches for drug resistance-associated gene mutations at the minor allele level<sup>10,11</sup>.

In the present study, we proposed to investigate whether ACT would select for intra-host parasite populations. For that, we compared circulating *P. falciparum* populations before and after treatment in children under five years old with uncomplicated or complicated malaria, treated with artemether-lumefantrine and artesunate respectively. We first explored the overall genetic diversity of collected isolates, then performed targeted-deep amplicon sequencing

searching for mutations in two drug resistance-associated genes *pfk13* and *pfdhfr* in majority and minority parasites populations (see BOX 1).

### **BOX 1**

Unlike standard WGS, targeted-deep amplicon sequencing makes possible to obtain sequencing depths of several thousand and therefore to identify rare events which correspond to the minority parasite populations of our sample. For each gene and each position, we can define three types of nucleotides:

1. The majority nucleotide that we observe during Sanger sequencing.
2. The nucleotides represented in a minority manner, in our case around 0.1 %, which correspond to the true polymorphism of the circulating parasites (errors in the polymerase of the parasite) and to the errors linked to the technique (for our study: PCR and Illumina). These errors are mostly equally distributed for all the nucleotides and give a baseline of the mutation rate observed for this sequence (considering that the errors related to the techniques are equivalent between the samples).
3. Finally, in rare cases, we found a nucleotide whose frequency, without being majority, was significantly higher than the base rate (in our case we estimate the threshold of significance about 1%). We have designated this kind of event a "minority allele".

#### **Application: identification of selected mutations under artemisinin treatment.**

The parasite clearance half-life of sensitive African parasites is between 2 to 3 hours. After 18 hours (time of D1 sampling), we have about hundred times fewer parasites than at D0 (+- 7 half-life). If a resistant parasite subpopulation exist at D0 under the detection threshold (in our case 1%) it will preferentially survive during drug pressure, thus its frequency will increase at D1. We define this minority allele as “emerging” because it appears after treatment (ie on D1 in our study).

## **Materials and Methods**

### **Ethical considerations**

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) in Benin. Before sample collection was initiated, written and informed consent was obtained from all participants.

### **Study sites and sample collection**

The study was conducted during the peak malaria season from March to September 2019 in Cotonou and Ouidah (Benin); two malaria-endemic communities (42 km apart). In these regions, malaria is mainly transmitted by *Anopheles gambiae* mosquito vector. Children suffering from complicated malaria (CM) were recruited in Cotonou at CHU-MEL (CHU-Mère et Enfant de la Lagune) hospital; and those suffering from uncomplicated malaria (UM) were recruited in Hôpital de zone de Ouidah. Standardized questionnaires and checklists were prepared to collect demographic and clinical data after children inclusion. For each patient, 3 to 6 mL of venous blood were collected at two time points: before any treatment (D<sub>0</sub>) and 18 hours after treatment (D<sub>1</sub>). Routine laboratory tests including thick/thin blood smear, complete blood count and biochemical analyses were performed directly on site. Blood samples were sent to the CERPAGE (Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance) for malaria confirmation using rapid diagnostic test (RDT) and microscopy at both time point.

As standard practice, children suffering from CM were treated with intravenous artesunate until they were able to continue oral medication. Those suffering from UM were treated with artemether-lumefantrine combination therapy.

### **Leukodepletion from venous blood**

Once blood samples received at CERPAGE laboratory, malaria confirmation was done using RDT and microscopy. Filter paper blood was also done for future DNA extraction. Finally, each venous blood sample was centrifuged to separate the plasma from the pellet containing red blood cells (infected and uninfected) and white blood cells.

To obtain highly enriched parasite material suitable for *P. falciparum* next-generation sequencing (NGS), blood samples were subjected to the 5 whole blood filtration (5WBF) procedure with minor

modifications. Briefly, instead of using whole blood, we used pellet obtained from previous centrifugation. Then, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from erythrocytes by Ficoll density gradient and stored in liquid nitrogen (Adams et al, 2017). Pellet was diluted with RPMI at 25% haematocrit. The mixture was filtered using 5 µM Minisart NML® syringe filter (Sartorius reference number: 17594K) that retains leukocytes carrying human DNA and allows the *P. falciparum*-infected erythrocytes to pass.

### **DNA extraction and drug resistance gene amplification**

DNA extraction was carried out on pelleted erythrocytes using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, France) following manufacturer's recommendations. Total genomic DNA was quantified using the Qubit® dsDNA high sensitivity kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendation to determine whether there was enough material for NGS. For each sample, *pfk13* and *pfdhfr* genes were amplified by a nested PCR. We used *pfdhfr* gene as control gene because it is a nuclear gene associated with SP resistance and we had good sequencing practice with it. Primers, PCR condition and the cycling conditions are listed in the supplementary table1. PCR products were detected using agarose gel electrophoresis and gel Red. DNA from *P. falciparum* 3D7 strain and water were used as positive and negative controls respectively.

### **Whole-genome and targeted-deep amplicon sequencings (TADs)**

Each parasite DNA sample was subjected to both whole-genome and targeted-deep amplicon sequencings. The process of sequencing was the same for both methods except that the whole genome sequencing (WGS) was performed using the entire DNA while for TADs, it has been used PCR amplicons from *pfk13* and *pfdhfr*.

DNA (entire or amplified) was fragmented with the Covaris S220 to about 150 bp, and libraries were constructed using the KAPA hyper Prep Library Preparation Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA) following the manufacturer's protocol. DNA was purified and library size selection was performed with AMPure Agencourt XPbeads. Libraries quality and quantity control were assessed using Qubit® for concentration and Bio Analyser 2100 Agilent for fragment size. Libraries were pooled at approximately equal concentration and sequenced on an Illumina NextSeq 500 instrument (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) to generate 150 bp paired-end reads at the GENOM'IC platform of Cochin Institute (Paris, France).

## Analysis

Regarding to the WGS, sequence data obtained from each sample was subjected to standard Illumina QC procedures. Each dataset was analyzed independently by mapping sequence reads to the *P. falciparum* 3D7 reference genome v.30 using the BWA software package (Li and Durbin 2009). Regarding to TADs, each dataset was mapped to the reference of each gene extracted from PlasmoDB. Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) was used to generate coverage statistics and depth estimates from the BWA mapping output.

Genetic distance between each couple of sample was calculated using the genetic diversity function of MEGA X. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood model. We use all coding position excluding highly polymorphic gene families (var, rifin, stevor etc...). All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 54003 positions in the final dataset. Standard GATK4 were used to call variant and construct a Neighbor-joining phylogenetic tree. Gene amplification or deletion were screened using PlasmoCNVScan software<sup>12</sup>

## Mutation rate calculation

To calculate mutation rate, we counted per-position the number of reads that differentiated from the produced consensus sequence for each sample. For that, we first removed reads in duplicates using the MarkDuplicates function of Picard tool (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Then we generated a pileup file using the mpileup function of SAMtools v.1.4 with the options -a to keep uncovered positions, and -d 100000 as the limit depth of coverage for each position. A homemade perl script was developed to calculate per-position the number of A, T, G and C from the pileup file. The following formula was applied to obtain the proportion of reads that differed from the produced consensus sequence:

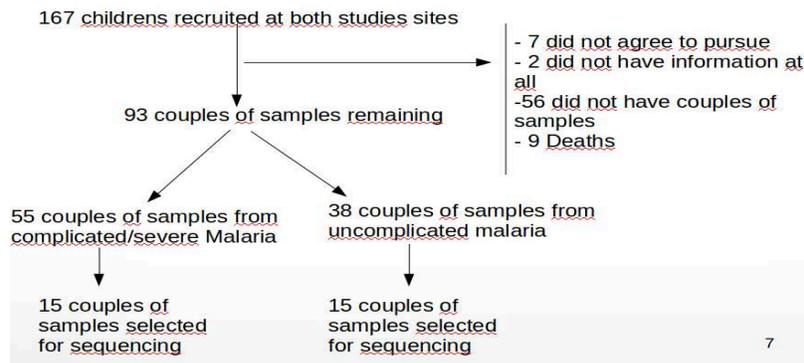
**Mutation rate= (total (sum of depth of the 4 coverage included indel coverage) - max (depth of coverage of the major nucleotide)) / total (sum of depth of the 4 coverage included indel coverage)**

A cut-off value of 1% was considered as the presence of a minority allele (see BOX 1). The choice of this cut-off was based on the average of our different mutation rates plus three time their standard deviation. The mutation rate calculation and comparison analyses were performed specifically on primers, gene sequences and whole amplicons (supplementary figure 2). Student's t test was used to compare intra-gene mutation rates and between D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub> samples; and Kruskal-Wallis test was used to compare inter-gene mutation rates.

## Results

### Study population characteristics

A total of 167 malaria-infected children under five years were enrolled in the study. Of these, 74 were discarded because of loss of tracking (i.e. no blood collection at D<sub>1</sub>), non-confirmation of malaria diagnosis, or withdrawal of parental consent. Among the 93 remaining children, 30 couples of samples from patients were randomly selected (consisting of 30 D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub> couples) for WGS (**Figure 1**).



**Figure 1: flow chart showing samples used**

The 30 patients were equally distributed between CM and UM patients. The average age of children in the CM group was 24 (10-51) months, and 36 (24-48) months for those in the UM group. Participant characteristics were similar between the two groups, except for number of female ( $p = 0.0017$ , Student  $t$ -test), level of haemoglobin ( $p = 0.002$ ), and anemia ( $p < 0.003$ ;  $p < 0.002$  for severe anemia) (Table 1).

**Table 1 - General characteristics of the recruited children**

Characteristics	Group1 = Complicated Malaria (n = 15)	Group2= Uncomplicated malaria (n = 15)	p-value
Age in month (median; IQR)	24 (10-51)	36 (24-48)	0.2
Female	10 (66.67%)	4 (26.67%)	0.0017
Male	5 (33.33%)	11 (73.33%)	0.052
Bednet possession†			
Yes	15 (100%)	11 (91.67%)	
No	0	1 (8.33%)	
Parasitemia (median,IQR)	117334 ( 8148.5-480000)	29271 (21013.5-167000)	0.3
HBx (Mean;SD)	5.60 (4.40, 7.80)	8.90 (7.70, 10.50)	0.002
Anaemia status†			
Severe anaemic (Hb<7.0g/dL)	11 (84.62%)	3(27.08%)	0.002
Anaemic (11.0<Hb≥7.0g/dL)	4 (15.38%)	9 (69.23%)	0.003

IQR: Interquartile Range; SD: Standard Deviation; †: n (%)

## Whole genome analysis

### Coverage profile of filtered samples at two time points

After performing the filtration procedure, DNA extraction and WGS, we observed that the isolates at D0 had an average of 95.7% of genome covered compared to 91.7% at D1 for a depth read of 20X. When isolating genes of interest such as *pfdhps*, *pfmdr*, *pfk13*, we observed coverage ranging between 80 and 100% at 20X at D0 and D1 (Supplementary Figure 1-a, 1-b). Given that the depth coverage is homogenous in our sampling, we have chosen a threshold of 50 mean coverage for whole genome analysis. Twenty-two couples of samples out of the 30 sequenced were retained for further analysis.

### Parasites population comparison

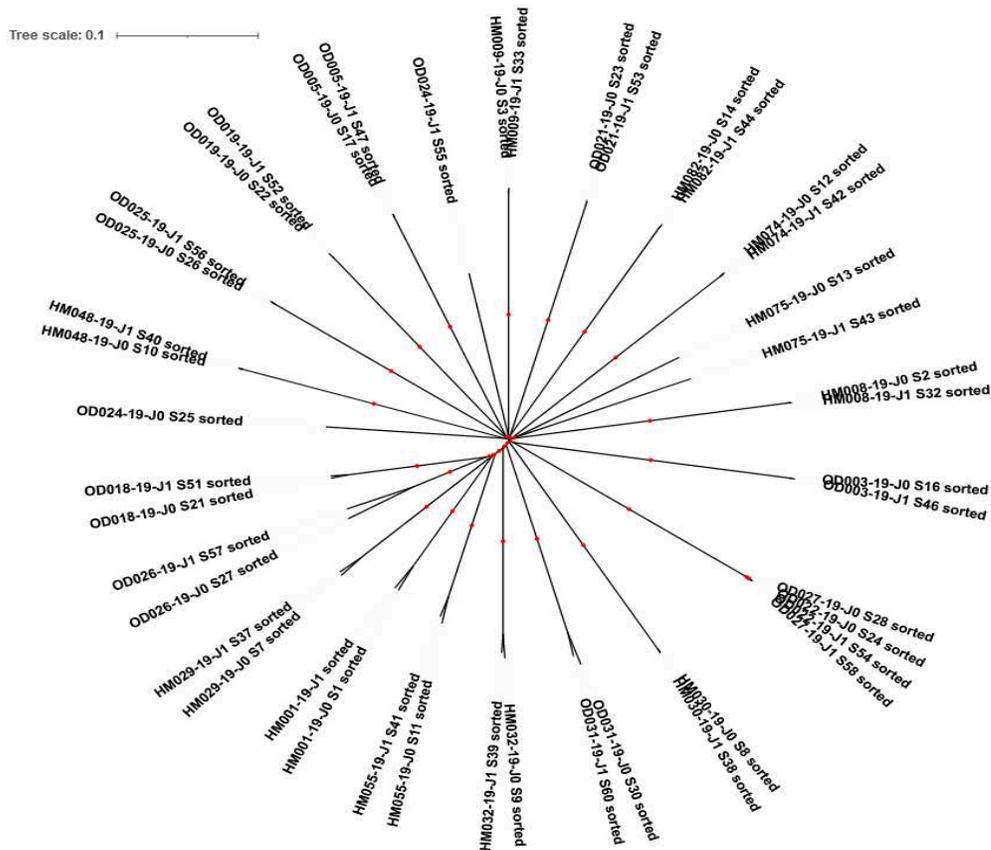
In order to check whether the 22 couples had similar genetic backgrounds we performed a pairwise genetic diversity analysis. Twenty out of 22 samples were very similar between D0 and D1 (Table 2). Two patients (HM075 and OD024) showed high genetic distance between D0 and D1, meaning that those two isolates correspond to unrelated parasite populations. The phylogenetic tree constructed from the whole genome sequence (figure 2) confirmed those results. Interestingly, based on WGS we were unable to distinguish difference between the parasites of patients suffering from uncomplicated or complicated malaria or from one site to another. We found no differences for amplification/deletion between D0 and D1 for the 22 couples.

**Table 2 - Estimates of Evolutionary Divergence between D0 and D1 sequences**

Patient	number of base substitution per site between D0 and D1
HM001	1,85388E-05
HM008	1,85438E-05
HM009	1,85331E-05
HM029	0
HM030	0
HM032	0
HM048	1,85434E-05
HM055	0
HM074	3,70938E-05
HM075	0,000593937
HM082	0
OD003	0

OD005	0
OD018	0
OD021	1,85406E-05
OD022	1,85389E-05
OD024	0,000537994
OD025	0
OD026	0
OD027	0
OD031	0

In yellow the two couples of patients showing high genetic distance between parasite populations before and after treatment.



**Figure 2:** Neighbor-joining phylogenetic tree of *P.falciparum* whole genome. SNPs from 44 *P.falciparum* isolates were used. Red dots on the phylogenetic tree represent bootstrap values > 75%.

## Targeted-deep amplicon sequencings (TADs)

### Prevalence of *pfdhfr* and *pfk13* mutations

With a mean depth coverage of 47798 and 69811 X for *pfdhfr* and *pfk13* respectively, we were able to have access to the *pfdhfr* and *pfk13* gene sequences for the 30 couples.

### *pfdhfr* and *pfk13* majority alleles

For *pfdhfr*, all the samples carried mutations on codons 51, 59 and 108 (N51I+C59R+S108N) while for *pfk13*, we found two patients carrying SNPs: the patient (OD027) was carrying the synonymous mutation at codon 676 (A676A) and the second patient (HM087) the non-synonymous mutation replacing V to I at codon 589 (V589I).

### *pfdhfr* and *pfk13* minority alleles

We identified three minority alleles for *pfdhfr* at position 175, 549 and 550 leading to a change in amino acids in position 59 (C to R) and 184 (F to L) for all the samples at D0 and D1. No sign of selection under treatment was found because no minority allele showed an increase frequency between D0 and D1. Interestingly the minority allele in position 175 correspond to a reversion to the wild type allele.

For *pfk13* gene twenty-seven mutations were identified with 15 emerging minority alleles (appeared after treatment - see BOX 1). Out of these 15 mutations, 9 were non-synonymous from which two previously described (M476I and P443S) and known to be associated with artemisinin resistance in south-East Asia. Three patients out of 30 (OD025, HM015 and HM087) accounted for 8 out of 9 non-synonymous mutations (Table 3).

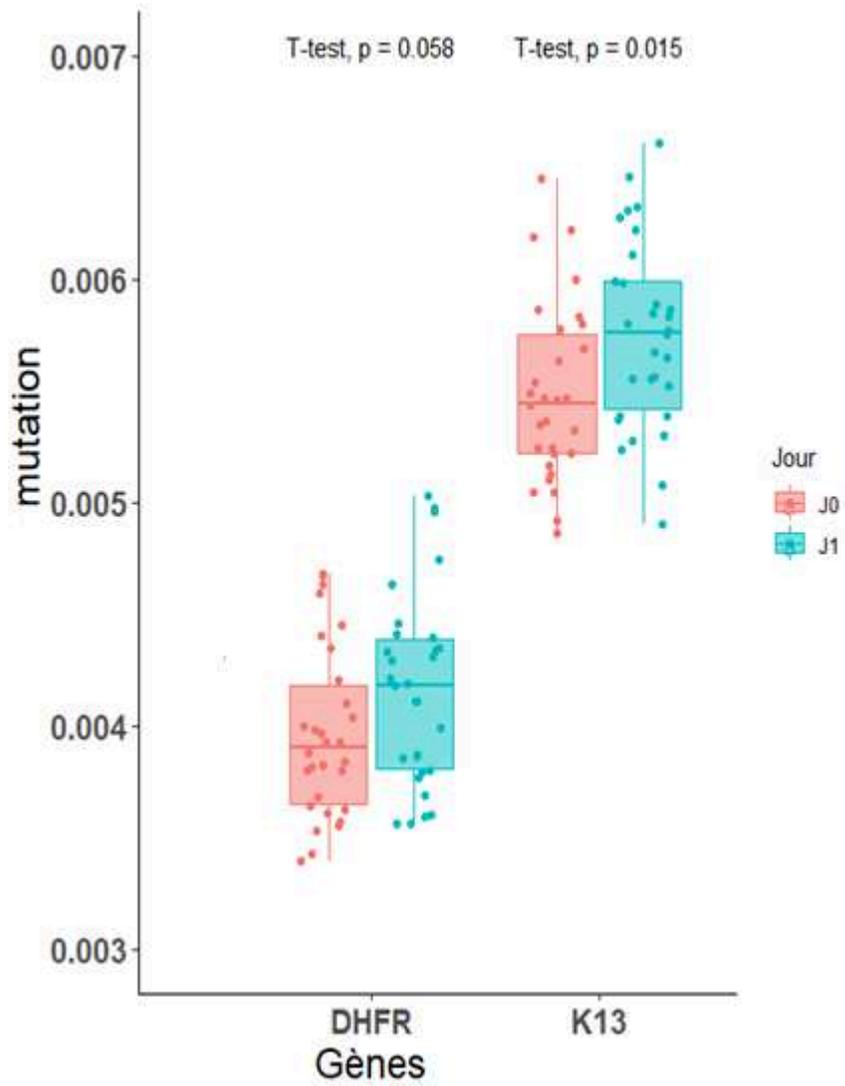
**Table 3:** Frequency of emerging minority allele.

Mutation	Patient	D0	D1	Increase (%)
<b>P441Q</b>	<b>OD025</b>	<b>0,00588</b>	<b>0,0101</b>	<b>172%</b>
<b>G453C</b>	<b>OD025</b>	<b>0,00614</b>	<b>0,0109</b>	<b>178%</b>
<b>P443T</b>	<b>OD025</b>	<b>0,00606</b>	<b>0,0106</b>	<b>175%</b>
<b>M476I</b>	<b>OD014</b>	<b>0,00161</b>	<b>0,0113</b>	<b>702%</b>
L505L	HM015	0,00362	0,0128	354%
E507E	HM087	0,00547	0,0105	192%
E556E	OD014	0,00491	0,015	305%
<b>I587V</b>	<b>HM087</b>	<b>0,00391</b>	<b>0,0103</b>	<b>263%</b>
V589V	HM087	0,00391	0,0103	263%
<b>K607N</b>	<b>HM015</b>	<b>0,00321</b>	<b>0,0112</b>	<b>349%</b>
<b>F614S</b>	<b>HM087</b>	<b>0,00545</b>	<b>0,0158</b>	<b>290%</b>
A627A	HM087	0,00566	0,0112	198%
<b>F656L</b>	<b>HM087</b>	<b>0,00391</b>	<b>0,0123</b>	<b>315%</b>
A676A	OD027	0,00174	0,0471	2707%
<b>H697R</b>	<b>HM015</b>	<b>0,00255</b>	<b>0,0128</b>	<b>502%</b>

Non-synonymous mutation in bold and line colored in red showed the mutations found to be associated with artemisinin resistance.

### Impact of ACTs on mutation rate

We have shown (BOX 1) that the nucleotides represented in a minority manner are mostly equally distributed for all the nucleotides and give a baseline of the mutation rate observed for each sequence (considering that the errors related to the techniques are equivalent between the samples). We compared the mean of *pfdhfr* mutation rate against that of *pfk13* and then for each gene, we compared the mutation rate at D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub>. We found a significant difference between the two gene ( $p < 2.22e^{-16}$ ) and between D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub> (t.test;  $p = 0.015$ ) for *pfk13* (Figure 3).



**Figure 3-** Comparaison de mutation rate between D0 and D1 for *pfdhfr* and *pfk13*.

## Discussion

Despite renewed prevention efforts, the burden of malaria remains a major public health problem in Africa. Artemisinin-based combination therapies (ACTs) are now the first-line drugs of choice, representing a fundamental component of malaria control strategy. However, due to the widespread use of ACTs, resistance to artemisinin derivatives has emerged and spread in Asia. In addition, studies have demonstrated the possible spontaneous emergence of artemisinin-resistant parasites in East Africa<sup>6,11-13</sup> raising concerns and confirming the importance of molecular surveillance in different African countries. Several tools such as deep sequencing, Targeted Amplicon Deep Sequencing (TADs) have been developed for molecular monitoring of key resistance genes in *P. falciparum*. However, studies only consider mutations in the major population. To address the urgent need to strengthen malaria surveillance, we proposed in our study a method that allow detection of genetic mutations in minor parasites populations for two *P. falciparum* genes associated to antimalarial drugs.

The aim of our study was to follow the dynamics of genomic response to treatment in two groups of Benin children suffering from uncomplicated and complicated malaria and treated by artemisinin derivatives drugs. To our knowledge, this study is the first to look for *falciparum* intra-host selection under artemisinin drug pressure.

One of the first observations made during this study was the similarity, at the genome scale, of isolates before (D0) and 18 hours (D1) after treatment. Because *falciparum* late stages are supposed to be sequestered by cyto-adhesion on the surface of endothelial cells, we have speculated that parasite population would change after 18h. In our study 90% (20/22) of the parasites were genetically similar before and after sequestration. The similarity between the samplings (D0 and D1) can be explained by the fact that, during the first cycles of infection, the parasites are not yet synchronized. This result is important because, as our aim was to look at dynamics of *falciparum* genome during artemisinin treatment, a unique parasite genomic background throughout the drug pressure was mandatory.

To explore the selection process precisely, we decided to deep sequence two genes *pfdhfr* and *pfk13* known to be involve in antimalarial drug resistance (pyrimethamin and artemisinin respectively).

For *pfdhfr* gene, we found that N51I+C59R+S108N triple mutation, conferring a high level of resistance to pyrimethamine, was found in all our isolates, implying that these mutants are mostly fixed in this region, as observed in other African countries<sup>14-18</sup>. The sustained high prevalence of triple mutant parasites is likely due to the SP persistent pressure because of its use for Intermittent Preventive Treatment (IPT-SP) and Seasonal malaria chemoprevention (SMC) in Benin. When looking for minority

alleles, we identified the presence of a subpopulation parasite harboring a reverse mutation at position 59 (R to C) in all patients whatever the time of sampling (D0 or D1). This finding is probably related to the fitness cost of C59R mutation at erythrocytic stages and supports the hypothesis that once pyrimethamine use will be drop out, a return of the drug-sensitive wild type haplotype may occur as was the case with chloroquine<sup>19,20</sup>. Anyway, the fact that such a subpopulation is present in our samples point out the high adaptation capability of *falciparum* genome.

Concerning the *pfk13* gene, we identified a nonsynonymous mutation V589I in one patient. This mutation was already reported in many African countries<sup>21-27</sup> and was not known to be associated with artemisinin derivative resistance or delayed clearance. When looking for minority alleles we found fifteen that emerged (increase frequency between D0 and D1) including nine non-synonymous mutations. If comparing with *pfdhfr*, where no emerging mutation occurs, the effect of artemisinin pressure on selection process is clear-cut. This result is reinforced by the significant mutation rate difference found for *pfk13* gene before and after drug pressure. Moreover, we identify two mutations (M476I and P443S) known to be associated with artemisinin resistance in South East Asia confirming ongoing intra-host positive selection process.

Of the nine non-synonymous emerging minority alleles, eight were found in only three patients. This could rely on a "mutator" phenotype already suspected for *falciparum* parasite. To confirm those finding we need to explore other genetic backgrounds (area and/or patients population) and other selective pressures (other drug or culture media). Anyway, we found *pfk13* mutation rate, whatever the genetic background, show a significant difference with *pfdhfr*. We know that the use of ACTs has strongly increased following their national implementation in health facilities. Therefore, drug pressure due to uncontrolled use (prescription, self-medication, artemisinin decoction) of ACTs may have affected the *pfk13* gene mutation rate.

Our study clearly demonstrates that artemisinin resistance associated with the *pfk13* mutation emerges continuously, within hours of standard treatment, in the African *falciparum* population without the need for spread from Southeast Asia. The fact that no mutations associated with artemisinin resistance have been identified as major allele in West African *falciparum* parasite population is probably related to the effectiveness of the partner drug. The only way to protect against the inevitable emergence of artemisinin resistance in the African *falciparum* population is therefore to ensure the efficacy of the partner drugs.

## References

1. Snow, R. W. Global malaria eradication and the importance of *Plasmodium falciparum* epidemiology in Africa. *BMC Med.* **13**, 23 (2015).
2. Sato, S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J. Physiol. Anthropol.* **40**, (2021).
3. WHO. Message from the WHO Regional Director for Africa, Dr Matshidiso Moeti, on World Malaria Day 2021 - World. *ReliefWeb* <https://reliefweb.int/report/world/message-who-regional-director-africa-dr-matshidiso-moeti-world-malaria-day-2021>.
4. Breman, J. G. Eradicating Malaria. *Sci. Prog.* **92**, 1–38 (2009).
5. [iptp-sp-updated-policy-brief-24jan2014-fr.pdf](#).
6. Uwimana, A. *et al.* Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* **26**, 1602–1608 (2020).
7. Ikeda, M. *et al.* Artemisinin - Resistant *Plasmodium falciparum* with High Survival Rates, Uganda, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 718–726 (2018).
8. Balikagala, B. *et al.* Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1163–1171 (2021).
9. Amambua-Ngwa, A. *et al.* Major subpopulations of *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa. *Science* **365**, 813–816 (2019).
10. Talundzic, E. *et al.* Next-Generation Sequencing and Bioinformatics Protocol for Malaria Drug Resistance Marker Surveillance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
11. L’Episcopia, M. *et al.* Targeted deep amplicon sequencing of antimalarial resistance markers in *Plasmodium falciparum* isolates from Cameroon. *Int. J. Infect. Dis.* **107**, 234–241 (2021).

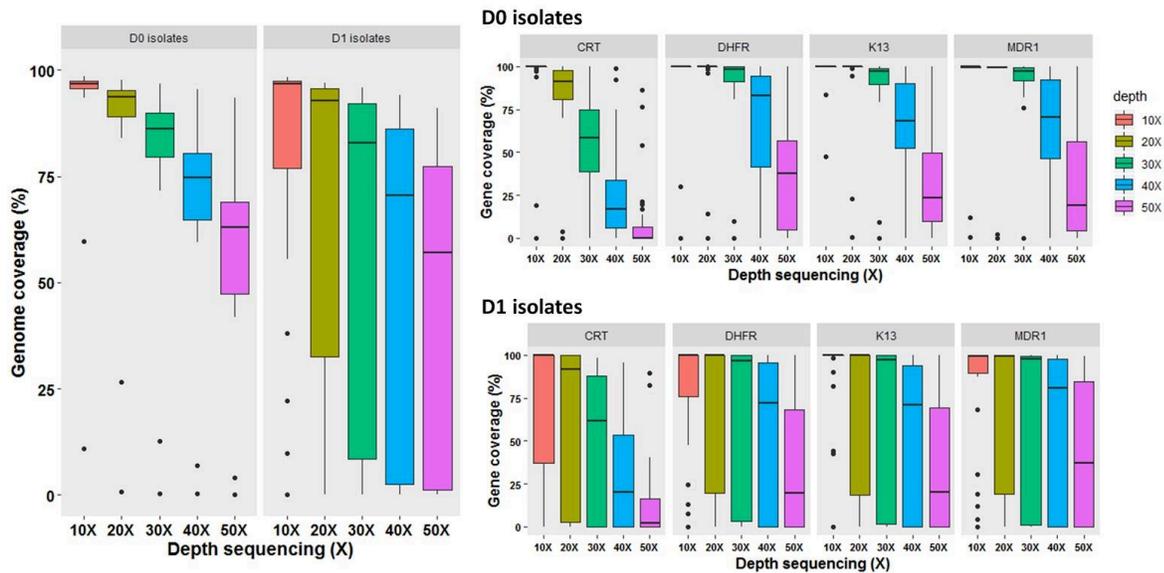
12. Beghain, J. *et al.* Plasmodium copy number variation scan: gene copy numbers evaluation in haploid genomes. *Malar. J.* **15**, (2016).
13. Asua, V. *et al.* Changing Prevalence of Potential Mediators of Aminoquinoline, Antifolate, and Artemisinin Resistance Across Uganda. *J. Infect. Dis.* **223**, 985–994 (2021).
14. Naidoo, I. & Roper, C. Mapping ‘partially resistant’, ‘fully resistant’, and ‘super resistant’ malaria. *Trends Parasitol.* **29**, 505–515 (2013).
15. Sridaran, S. *et al.* Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African Plasmodium falciparum parasite populations. *Malar. J.* **9**, (2010).
16. Maiga, O. M. *et al.* Superiority of 3 Over 2 Doses of Intermittent Preventive Treatment With Sulfadoxine-Pyrimethamine for the Prevention of Malaria During Pregnancy in Mali: A Randomized Controlled Trial. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 215–223 (2011).
17. Fagbemi, K. A. *et al.* Analysis of sulphadoxine–pyrimethamine resistance-associated mutations in Plasmodium falciparum isolates obtained from asymptomatic pregnant women in Ogun State, Southwest Nigeria. *Infect. Genet. Evol.* **85**, 104503 (2020).
18. Savigel, S. S. *et al.* Low prevalence of highly sulfadoxine-resistant dihydropteroate synthase alleles in Plasmodium falciparum isolates in Benin. *Malar. J.* **20**, (2021).
19. Mohammed, A. *et al.* Trends in chloroquine resistance marker, Pfcrt-K76T mutation ten years after chloroquine withdrawal in Tanzania. *Malar. J.* **12**, (2013).
20. Salissou, A. *et al.* Low Prevalence of Pfcrt Resistance Alleles among Patients with Uncomplicated Falciparum Malaria in Niger Six Years after Chloroquine Withdrawal. *Malar. Res. Treat.* **2014**, 1–7 (2014).

21. Ashley, E. A. *et al.* Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **371**, 411–423 (2014).
22. Takala-Harrison, S. *et al.* Independent Emergence of Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *J. Infect. Dis.* **211**, 670–679 (2015).
23. Taylor, S. M. *et al.* Absence of Putative Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: A Molecular Epidemiologic Study. *J. Infect. Dis.* **211**, 680–688 (2015).
24. Menard, S. *et al.* Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates. *Malar. J.* **15**, (2016).
25. Madamet, M. *et al.* Absence of association between polymorphisms in the K13 gene and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites at day 3 after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 754–756 (2017).
26. Huang, F. *et al.* Genomic Epidemiology of Antimalarial Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* in Southern China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, (2021).
27. Nzoumbou-Boko, R. *et al.* Molecular assessment of kelch13 non-synonymous mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Central African Republic (2017–2019). *Malar. J.* **19**, (2020).

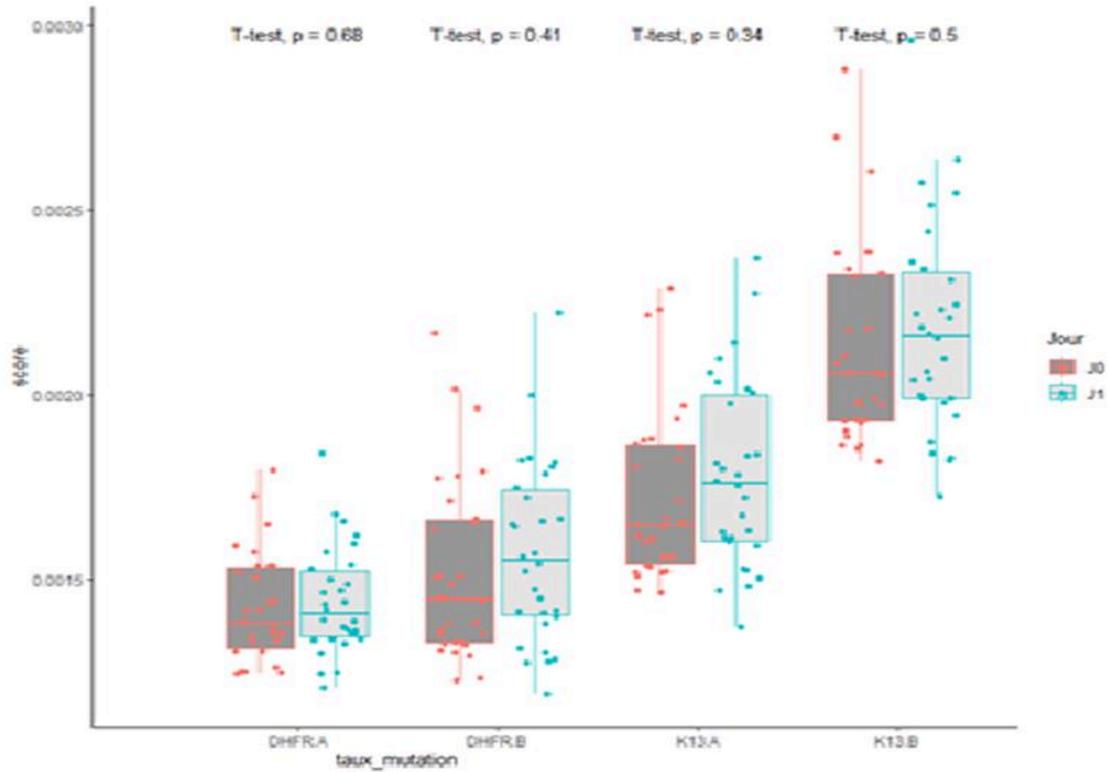
## Supplementary files

### Supplementary file1-Primers and PCR conditions used for the amplification

Mix preparation for one sample (25uL)		
Taq polymerase promega	k13	dhfr
MgCl <sub>2</sub>	3	3
Tr 10X	5	5
dNTPs	2	2
amorce upper	0.05	0.25
amorce lower	0.05	0.25
Taq promega	0.25	0.25
H <sub>2</sub> O	13.65	13.25
Distribute 24uL + 1uL d'ADN		
<b>k13 conditions</b>		<b>DHFR conditions</b>
94°C 5min		94°C 3 min
94°C 30 sec		92°C 30 sec
60°C 1 min30 sec	X 40 cycles	45°C 45 X 45
72°C 1 min30 sec		65°C 45 sec
72°C 10 min		65°C 3 min
15°C INFINI		4°C INFINI
		94°C 3 min
		92°C 30 sec
		50°C 45 sec
		65°C 45 X 30
		65°C 3min
		4°C INFINI
<b><i>pfk13</i> primers</b>		<b><i>pfdhfr</i> primers</b>
n1_k13S: CGGAGTGACCAAATCTGGGA		AMP1F: 5'-TTTATATTTTCTCCTTTTAA-3'
n1_k13AS: GGGAAATCTGGTGGTAACAGC		AMP2R: 5'-CATTTTATTATTATTCGTTTCT-3'
n2_k13S: GCCAAGCTGCCATTCATTTG		AMP2R: 5'-CATTTTATTATTATTCGTTTCT-3'
n2_k13AS: GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA		AMP3F: 5'-TGATGGAACAAGTCTGCGAC-3'



**Supplementary Figure1- *P. falciparum* 3D7 genome coverage by Depth sequencing. a-** coverage mean of the *P. falciparum* genome at different coverage depths at J0 and J1. **b-** *pfprt*, *pfdhfr*, *pfk13*, *pfmdr-1* genes coverage by the deep of coverage at J0. **c-** *pfprt*, *pfdhfr*, *pfk13*, *pfmdr-1* genes coverage by the deep of coverage at J1.



**Supplementary figure2-Comparison of mutation rate of different primers. The mutation rate of each primer was calculated and compared to each other.**

## **Partie IV: Discussion générale et conclusion**

Plusieurs traitements ont été utilisés au fil des années dans la lutte contre le paludisme car *P. falciparum* a montré une grande capacité à développer une chimiorésistance vis-à-vis des différents antipaludiques recommandés par l’OMS. Dès lors, surveiller l’émergence et la propagation de la résistance aux antipaludiques est devenu primordial dans les régions endémiques au paludisme. Aussi, les marqueurs moléculaires de résistance parasitaire à la sulfadoxine pyriméthamine (SP) et à l’artémisinine et ses dérivés, respectivement utilisés en TPI chez la femme enceinte et en première intention dans le traitement du paludisme simple et grave ont fait l’objet d’une attention particulière dans ce travail.

Dans le contexte du paludisme pendant la grossesse (aussi appelé paludisme placentaire), les femmes enceintes sont exposées à des infections palustres avec des conséquences sur la santé de la mère et du nouveau-né. Pour remédier à cette situation, l’OMS recommande un ensemble de mesures préventives comprenant un traitement préventif intermittent par la SP (TPI-SP) pour toutes les femmes enceintes à partir du second trimestre de la grossesse<sup>135-138</sup>. Malgré l’efficacité prouvée du TPI-SP à réduire le risque de l’insuffisance pondérale des nouveau-nés dans différents contextes de résistance parasitaire<sup>139,140</sup>, plusieurs études ont montré que la prise de deux doses de TPI-SP à un mois d’intervalle comme initialement préconisée par l’OMS devenait insuffisante pour une bonne couverture de protection de la grossesse<sup>135,141,142</sup>. Ajoutée à ces raisons, la démonstration d’un effet bénéfique dose-dépendant du TPI-SP sur le poids de naissance a poussé l’OMS à réviser sa politique et à recommander une prise mensuelle de TPI-SP à partir du deuxième trimestre de la grossesse<sup>135</sup>. Le Ghana a adopté et déployé cette politique dès 2013, se positionnant en avance sur d’autres pays tels que le Bénin, l’Angola, l’Ouganda, le Madagascar où la mise en œuvre a été un peu plus tardive<sup>143-145</sup>. C’est dans ce cadre que nous avons entrepris de réaliser une étude génomique sur des isolats de *P. falciparum* provenant d’une cohorte de femmes enceintes au Ghana. Ces femmes ont été recrutées au cours de leur première consultation prénatale et à l’accouchement dans deux communautés de la région Volta du Ghana (Adidome et Battor). L’une des particularités de cette étude était de caractériser les isolats parasitaires de femmes enceintes avant et après l’administration du TPI-SP dans une zone rurale du Ghana. Les résultats de cette étude ont été valorisés par la publication de l’article 1 de cette thèse qui a évalué la relation entre la prise du TPI-SP et l’issue de la grossesse d’une part et son impact sur les populations parasitaires d’autre part.

La première observation majeure faite dans cette étude est la proportion particulièrement élevée de femmes (66%) dans cette zone rurale ayant reçu au moins trois doses de TPI-SP. Cette prévalence apparaît plutôt élevée si elle est comparée à celle des autres pays de la sous-région<sup>143</sup>, mais reste en cohérence avec les observations de Quakyi et al, (2019) qui avaient rapporté une couverture similaire en zone urbaine au Ghana. Ce résultat est sans aucun doute lié à la politique pro-active du ministère de la santé du Ghana qui a initié des campagnes de sensibilisation sur les effets délétères du paludisme au cours de la grossesse. Une participation précoce des femmes aux consultations prénatales, comme nous avons décrit au Ghana, et une augmentation de la fréquence des visites prénatales sont en effet les clés du succès pour garantir la mise en œuvre de cette nouvelle politique de prévention<sup>146</sup>.

Il a également été observé dans cette étude que la prise de plus de trois doses de TPI-SP était associée à une augmentation du poids de naissance d'environ 360g sur les deux sites d'étude indiquant clairement que le nouveau schéma de déploiement du TPI-SP mis en œuvre au Ghana a un impact bénéfique sur le poids de naissance. Ce résultat est corroboré par des études similaires qui ont rapporté un impact dose-dépendant du TPI-SP sur le poids à la naissance<sup>144,147-151</sup> malgré la présence élevée de parasites résistants à la SP en Afrique. Dans notre étude, la quintuple mutation **IRNI-A/FGKAA** située sur les gènes *dhfr/dhps* était l'haplotype dominant retrouvé presque dans la moitié des isolats caractérisés. Cette observation est en concordance avec celles rapportées dans d'autres régions d'Afrique de l'Ouest et du Centre où on note également une quasi-saturation en haplotype triple mutants *pfdhfr*<sup>152-155</sup>. Ce niveau de résistance et de propagation des parasites portant ces marqueurs de résistance a d'ailleurs poussé l'OMS, dès les années 2000, à recommander le remplacement de la SP par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le traitement des accès cliniques simples de paludisme dans toute l'Afrique.

Le bénéfice clinique du TPI-SP sur le poids de naissance retrouvé dans notre étude malgré le fort niveau de résistance à la SP également observé par la fréquence des génotypes résistant pourrait s'expliquer par une activité résiduelle de la SP sur la parasitémie, suffisante pour infléchir l'impact clinique de cette dernière. La résistance parasitaire à la SP est en effet une résistance tardive, avec des échecs principalement retrouvés à J14/J28 post traitement, ce qui pourrait suggérer qu'une réduction de la charge parasitaire, à défaut de la clairance parasitaire totale, puisse être suffisante pour atténuer les effets néfastes du paludisme sur la fonction placentaire et la croissance fœtale. C'est en effet une des explications qui a été proposée pour expliquer l'absence ou le moindre impact de l'infection palustre sur

la croissance fœtale chez les multigravides<sup>153</sup>. Une autre hypothèse avancée, serait la capacité du TPI-SP à traiter ou à prévenir les infections parasitaires en fonction du niveau de résistance des parasites à la SP (Desai et al, 2015). Toutefois, on ne peut exclure que l'effet bénéfique de la SP sur le poids de naissance soit indépendant de ses autres propriétés antibiotiques et donc non affectées par la résistance de *P. falciparum*. Ainsi il a été proposé que l'efficacité de la SP serait liée à ces effets anti-microbiens à large spectre<sup>140,147,156</sup> ou des effets d'immuno-modulation similaires à ceux décrits par Church JA et al, (2015) pour le cotrimoxazole<sup>157</sup>. Plusieurs études ont démontré que les molécules de la famille des sulfamides (dont fait partie la sulfadoxine) sont aussi utilisées dans le traitement des infections sexuellement transmissibles (IST) et des vaginoses<sup>158</sup>. Un effet sur ces affections parallèles pourrait aussi contribuer au bénéfice du TPI-SP observé. De même, une exposition à la sulfadoxine inhiberait également les réponses inflammatoires maternelles aux infections qui sont connues pour déclencher des naissances prématurées<sup>147</sup>.

Notre étude a également montré qu'en dépit de l'association positive entre la prise du TPI-SP et la croissance in utero, l'augmentation des doses du TPI-SP entraîne une pression sélective forte sur les populations parasitaires. En effet nous avons noté une augmentation significative de la fréquence de la mutation *pf dhps* A581G dans les populations parasitaires des isolats de femmes à l'accouchement par rapport à celles recrutées à la première consultation prénatale avant l'initiation du TPI-SP. Ce résultat suggère une pression de sélection induite par la prise de TPI-SP qui modifie la structure des populations parasitaires détectées chez les femmes en fin de grossesse. Ces données sont cohérentes avec les résultats de Tornyigah et al, (2020). La mutation *pf dhps* A581G est associée à un niveau élevé de la résistance à la SP. Une utilisation continue du TPI-SP exercerait une pression médicamenteuse encore plus forte sur les populations parasitaires conduisant inévitablement à des échecs thérapeutiques comme l'ont suggéré les études de Harrington WE et ses collaborateurs (2009) et Minja DT et ses collaborateurs (2013)<sup>159</sup>.

Il devient donc impératif de trouver des alternatives à la SP pour le TPI pendant la grossesse. Dans l'attente d'un changement thérapeutique et dans le but d'optimiser le TPI pendant la grossesse, il s'avère nécessaire de renforcer le suivi de l'émergence et de la propagation de cette résistance chez les femmes enceintes.

En raison de la situation évoquée précédemment, de plus en plus d'études sont menées pour évaluer une utilisation des CTAs dans le TPI en remplacement de la SP chez les femmes enceintes<sup>160,161</sup>. Or, la résistance à l'artémisinine a été identifiée quelques années auparavant en Asie et tout récemment en

Afrique de l'Est. L'impact de l'utilisation des CTAs en traitement de masse sur les populations parasitaires reste à déterminer. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons abordé l'impact des traitements de premières lignes (CTAs), notamment celui des premières doses d'artémisinine sur la dynamique du génome parasite par une approche de génotypage complet. Ce travail s'est appuyé sur une étude de cohortes d'enfants conduite au Bénin. Les cohortes utilisées, étaient constituée d'enfants âgés de moins de cinq ans recrutés dans deux communes du Bénin distante de 42 km. Ces enfants souffraient de paludisme simple ou de paludisme grave et ont été respectivement traités à l'artémether-lumefantrine et à l'artusanate en IV conformément aux recommandations nationales. Le «whole genome sequencing» et le «targeted amplicon deep sequencing» ont été réalisés sur les isolats issus de ces cohortes.

L'utilisation d'une technique de filtration du sang total dans cette étude a été nécessaire afin de réduire la contamination de l'ADN parasite par l'ADN humain. Nous avons donc mis au point une technique de filtration appelée « 5WBF » qui a permis d'optimiser les résultats de séquençage et a donné lieu à l'article 2 de cette thèse. Cette méthode comparée à la méthode sWGA, s'est avérée très compétitive car elle a permis la réalisation d'un séquençage de génome entier de très bonne qualité à moindre coût. Elle offrait également pour un coût identique à celui du sWGA, une uniformité dans la profondeur de couverture des génomes de *P. falciparum* générés, ce qui a rendu possible une analyse fine de la variation du nombre de copie contrairement au sWGA.

Les travaux réalisés sur les cohortes d'enfants et l'analyse des génomes obtenus sont présentés dans l'article 3 de cette thèse. La première information qui se dégage de cette étude est une grande homogénéité dans le génome des différents isolats collectés aux premières heures de traitement et ce, indépendamment du type de paludisme (simple ou compliqué) et du site d'étude (Ouidah ou Cotonou). Ces isolats obtenus avant et 18 heures après traitement étaient génétiquement identiques à l'exception de deux couples. Cette identité entre les isolats pourrait s'expliquer par le fait que lors des premiers cycles d'infection les parasites ne sont pas encore synchronisés. De ce fait, on observe la circulation des mêmes parasites au cours de ce laps de temps tel que décrit par Benjamas Intharabut et ses collaborateurs en 2019. Concernant les deux couples d'isolats faisant exception, il est possible que l'on observe la recirculation de parasites séquestrés. Cette hypothèse reste à vérifier par une étude détaillée de leur génotype et plus particulièrement l'étude de l'expression différentielle des gènes.

Les techniques de séquençage du génome entier bien que très pertinentes pour explorer l'ensemble du génome, n'ont pas sensibilité suffisante pour identifier les sous-populations faiblement représentées, en particulier les événements de sélection portant sur des populations minoritaires. Afin d'évaluer plus finement l'impact potentiel de la pression du traitement par artémisinine sur des populations minoritaires, nous avons utilisé la technique du «targeted amplicon deep sequencing» (TADs) qui nous a permis de réaliser des séquençages avec de très grandes profondeurs de lecture (plusieurs milliers) et ainsi de détecter des allèles minoritaires et des mutations rares. Nous avons ciblé le gène *pfk13*, qui est l'un des seuls marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine actuellement identifié dans les zones d'endémie et avons comparé ces résultats avec ceux du gène *pfdhfr* utilisé comme gène contrôle (gène nucléaire associé à la résistance à la SP).

Nous avons identifié 27 allèles minoritaires de *pfK13*, dont quinze montrant une fréquence accrue entre J0 et J1 (définis comme allèles minoritaires émergents). La comparaison avec *pfdhfr*, où aucune mutation émergente ne se produit, montre que l'effet de la pression de l'artémisinine sur le processus de sélection est important. Ce résultat est renforcé par la différence significative du taux de mutation trouvé pour le gène *pfk13* avant et après traitement. De plus, nous avons pu montrer la sélection relative de deux mutations (M476I et P443S) connues pour être associées à la résistance à l'artémisinine en Asie du Sud-Est, confirmant ainsi le processus de sélection positive intra-hôte en cours.

Sur les quinze allèles minoritaires, neuf étaient des parasites émergents non synonymes et huit parmi les neuf ont été trouvés chez seulement trois patients. Cela pourrait reposer sur un phénotype "mutateur" propre à certains génomes, phénomène déjà suspecté chez *P. falciparum*. Si ces résultats sont confirmés dans d'autres zones d'endémie il conviendra de définir s'il existe un fond génétique propice à l'émergence de mutations associées à la résistance aux dérivés d'artémisinine. Quoiqu'il en soit, le taux de mutation élevé pour *pfk13* après traitement montre que la pression médicamenteuse exercée par une utilisation non contrôlée des médicaments à base d'artémisinine (prescription, automédication, prise d'artémisinine sous forme de décoction) pourrait entraîner l'émergence des parasites résistants à l'artémisinine en Afrique.

Une explication avancée à l'absence de parasite résistant en Afrique de l'Ouest est l'impact négatif des mutations *pfk13* sur la croissance parasitaire et qui engendre un coût sur le fitness des parasites<sup>162</sup>. Mais la principale explication retenue à la quasi absence de ces mutations chez les populations

majoritaires de parasites en Afrique, est celle de la bonne efficacité des molécules partenaires aux dérivés d'artémisinine, dans notre cas la luméfantrine, dont l'efficacité a été démontré par plusieurs études.

Au travers de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que les médicaments recommandés par l'OMS dans le traitement du paludisme sont encore efficaces pour leur utilisation au Ghana et au Bénin. Précédemment, l'accent était mis sur les risques de propagation de la résistance aux antipaludiques de l'Asie vers l'Afrique. A l'inverse, notre étude montre la place principale de l'émergence locale de la résistance. Chez les femmes enceintes sous TPI-SP, nos données démontrent que la pression exercée par l'intensification des campagnes de TPI-SP sur les populations parasitaires est forte et peut mener à la sélection rapide de parasites montrant une forte résistance. Chez les enfants sous traitement par CTA, nous avons montré que l'émergence des parasites résistants aux dérivés de l'artémisinine intra hôte est fréquente (résultats à mettre en perspective avec une récente étude menée en Ouganda montrant que l'émergence des mutations associées à une diminution de la clairance parasitaire arrive fréquemment chez les patients traités par monothérapie<sup>163</sup>). Si aucune mutation associée à la résistance à l'artémisinine n'a encore été rapporté à ce jour en Afrique de l'Ouest et Centrale ceci ne peut s'expliquer que par la bonne efficacité des molécules partenaires aux dérivés d'artémisinine. En effet, c'est en préservant l'efficacité des molécules partenaires que nous pourrions freiner l'émergence inéluctable de la résistance à l'artémisinine.

## Références bibliographiques

1. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* **3**, 5 (2010).
2. who. The ‘World malaria report 2019’ at a glance. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/world-malaria-report-2019> (2019).
3. WHO. World Malaria Report 2020. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020> (2020).
4. Cpa, H. *et al.* Dynamics of Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Throughout Pregnancy: A Preconception Cohort Study in Benin. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **71**, 166–174 (2020).
5. Rogerson, S. J., Mwapasa, V. & Meshnick, S. R. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 14–22 (2007).
6. Bull, P. C. *et al.* Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat. Med.* **4**, 358–360 (1998).
7. Stanistic, D. I. *et al.* Acquisition of Antibodies against Plasmodium falciparum Merozoites and Malaria Immunity in Young Children and the Influence of Age, Force of Infection, and Magnitude of Response. *Infect. Immun.* **83**, 646–660 (2015).
8. Mwai, L. *et al.* Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar. J.* **8**, (2009).
9. Benoit-Vical, F., Paloque, L. & Augereau, J.-M. Résistance de l’agent du paludisme, Plasmodium falciparum aux combinaisons thérapeutiques à base d’artémisinine (ACTs): Craintes d’une chimiorésistance généralisée. *Bull. Académie Natl. Médecine* **200**, 477–490 (2016).
10. White, N. J. *et al.* Malaria. *The Lancet* **383**, 723–735 (2014).

11. Torniyigah, B. *et al.* Effect of Drug Pressure on Promoting the Emergence of Antimalarial-Resistant Parasites among Pregnant Women in Ghana. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, (2020).
12. O. ter Kuile, F., van Eijk, A. M. & Filler, S. J. Effect of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on the Efficacy of Intermittent Preventive Therapy for Malaria Control During Pregnancy: A Systematic Review. *JAMA* **297**, 2603 (2007).
13. Mpogoro, F. J. *et al.* Uptake of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine for malaria during pregnancy and pregnancy outcomes: a cross-sectional study in Geita district, North-Western Tanzania. *Malar. J.* **13**, 1–14 (2014).
14. iptp-sp-updated-policy-brief-24jan2014-fr.pdf.
15. Ashley, E. A. *et al.* Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **371**, 411–423 (2014).
16. Noedl, H. *et al.* Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2619–2620 (2008).
17. Witkowski, B. *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.* **13**, 1043–1049 (2013).
18. Organisation mondiale de la santé. *World malaria report 2018*. (2018).
19. Dondorp, A. M. *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **361**, 455–467 (2009).
20. Uwimana, A. *et al.* Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* **26**, 1602–1608 (2020).
21. Ikeda, M. *et al.* Artemisinin - Resistant *Plasmodium falciparum* with High Survival Rates, Uganda, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 718–726 (2018).

22. Joy, D. A. *et al.* Early Origin and Recent Expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* **300**, 318–321 (2003).
23. Artemisia. Médecine chinoise traditionnelle et traitement de la malaria. *La Vie Re-Belle* <http://lavierebelle.org/medecine-chinoise-et-traitement-de-la-malaria>.
24. Bruce-Chwatt, L. J. & Zulueta, J. de. *The rise and fall of malaria in Europe: a historico-epidemiological study*. (Oxford University Press, 1980).
25. Yalcindag, E. *et al.* Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 511–516 (2012).
26. Kaufman, T. S. & Rúveda, E. A. The Quest for Quinine: Those Who Won the Battles and Those Who Won the War. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 854–885 (2005).
27. Bhattacharjee, D. & Shivaprakash, G. Drug Resistance in Malaria-in a nutshell. *J. Appl. Pharm. Sci.* 137–143 (2016) doi:10.7324/JAPS.2016.60324.
28. *Paludisme*. (Ellipses, 1991).
29. 9782257203960\_medecine-tropicale-6-ed\_Sommaire.pdf.
30. Duval, L. Plasmodium chez les grands singes africains1. *Rev. Primatol.* (2012) doi:10.4000/primatologie.1178.
31. Oguike, M. C. *et al.* Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities. *Int. J. Parasitol.* **41**, 677–683 (2011).
32. Singh, B. *et al.* A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *The Lancet* **363**, 1017–1024 (2004).
33. Singh, B. & Daneshvar, C. Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 165–184 (2013).
34. Ménard, R. Paludisme : une nouvelle vie pour *Plasmodium*. *médecine/sciences* **22**, 921–923 (2006).

35. Prudêncio, M., Mota, M. M. & Mendes, A. M. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.* **27**, 565–574 (2011).
36. cours.pdf.
37. Jensen, A. R., Adams, Y. & Hviid, L. Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunol. Rev.* **293**, 230–252 (2020).
38. Plewes, K., Turner, G. D. H. & Dondorp, A. M. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating falciparum malaria: *Curr. Opin. Infect. Dis.* **31**, 69–77 (2018).
39. Aird, W. C., Mosnier, L. O. & Fairhurst, R. M. Plasmodium falciparum picks (on) EPCR. *Blood* **123**, 163–167 (2014).
40. Resende, M. *et al.* Identification of glycosaminoglycan binding regions in the Plasmodium falciparum encoded placental sequestration ligand, VAR2CSA. *Malar. J.* **7**, (2008).
41. Viebig, N. K. *et al.* A single member of the *Plasmodium falciparum* var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A. *EMBO Rep.* **6**, 775–781 (2005).
42. Scherf, A. *et al.* Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. *EMBO J.* **17**, 5418–5426 (1998).
43. Tuikue Ndam, N. G. *et al.* Variable Adhesion Abilities and Overlapping Antigenic Properties in Placental *Plasmodium falciparum* Isolates. *J. Infect. Dis.* **190**, 2001–2009 (2004).

44. Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I. & Miller, L. H. Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 293–310 (2000).
45. Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Gorm Pedersen, A. & Lavstsen, T. Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Diversity in Seven Genomes – Divide and Conquer. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000933 (2010).
46. Doritchamou, J. Y. A. *et al.* Placental malaria vaccine candidate antigen VAR2CSA displays atypical domain architecture in some Plasmodium falciparum strains. *Commun. Biol.* **2**, (2019).
47. Bockhorst, J. *et al.* Structural polymorphism and diversifying selection on the pregnancy malaria vaccine candidate VAR2CSA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **155**, 103–112 (2007).
48. Raghavendra, K., Barik, T. K., Reddy, B. P. N., Sharma, P. & Dash, A. P. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol. Res.* **108**, 757–779 (2011).
49. Bermejo, A. & Veeken, H. Insecticide-impregnated bed nets for malaria control: a review of the field trials. *Bull. World Health Organ.* **70**, 293–296 (1992).
50. 9789241550499-eng.pdf.
51. Coldiron, M. E., Von Seidlein, L. & Grais, R. F. Seasonal malaria chemoprevention: successes and missed opportunities. *Malar. J.* **16**, (2017).
52. Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P. & Krudsood, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J. Parasitol.* **47**, 93 (2009).
53. Snounou, G. *et al.* A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 687–692 (1999).
54. White, N. J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1413–1422 (1997).

55. PHARMACOMédicale. \*Antipaludéens : Les points essentiels.  
<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antipaludeens-les-points-essentiels>.
56. Toovey, S. Malaria: current prophylaxis options. *South Afr. Fam. Pract.* **46**, 43–45 (2004).
57. Sibley, C. H. Understanding drug resistance in malaria parasites: Basic science for public health. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 107–114 (2014).
58. OMS. Paludisme : situation mondiale 2020 (Organisation mondiale de la santé). *Paludisme : situation mondiale 2020 (Organisation mondiale de la santé)*  
<http://www.mesvaccins.net/web/news/16794-paludisme-situation-mondiale-2020-organisation-mondiale-de-la-sante>.
59. McKeage, K. & Scott, L. J. Atovaquone/Proguanil: A Review of its Use for the Prophylaxis of Plasmodium falciparum Malaria. *Drugs* **63**, 597–623 (2003).
60. Srivastava, I. K., Rottenberg, H. & Vaidya, A. B. Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a Malarial Parasite. *J. Biol. Chem.* **272**, 3961–3966 (1997).
61. Srivastava, I. K. & Vaidya, A. B. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1334–1339 (1999).
62. El-Mir, M.-Y. *et al.* Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *J. Biol. Chem.* **275**, 223–228 (2000).
63. China Cooperative Research Group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Chemical studies on qinghaosu (artemisinin). China Cooperative Research Group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. *J. Tradit. Chin. Med. Chung Tsa Chih Ying Wen Pan* **2**, 3–8 (1982).

64. Talisuna, A. O., Bloland, P. & D'Alessandro, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 235–254 (2004).
65. *Biodiversité du paludisme dans le monde*. (Libbey [u.a.], 2004).
66. Pradines, B., Bertaux, L., Pomares, C., Delaunay, P. & Marty, P. Reduced in vitro susceptibility to artemisinin derivatives associated with multi-resistance in a traveller returning from South-East Asia. *Malar. J.* **10**, (2011).
67. Rapport sur le paludisme dans le monde 2015 - World. *ReliefWeb*  
<https://reliefweb.int/report/world/rapport-sur-le-paludisme-dans-le-monde-2015>.
68. Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H. & Meshnick, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 209–218 (2002).
69. Noedl, H. *et al.* Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2619–2620 (2008).
70. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-CDS-GMP-2019.17> (2019as).
71. Ariey, F. *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **505**, 50–55 (2014).
72. Straimer, J. *et al.* K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* **347**, 428–431 (2015).
73. Ghorbal, M. *et al.* Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Biotechnol.* **32**, 819–821 (2014).
74. Dhanoa, B. S., Cogliati, T., Satish, A. G., Bruford, E. A. & Friedman, J. S. Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Hum. Genomics* **7**, (2013).

75. Adams, J., Kelso, R. & Cooley, L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* **10**, 17–24 (2000).
76. Zhang, M. *et al.* Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science* **360**, (2018).
77. Bushell, E. *et al.* Functional Profiling of a Plasmodium Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* **170**, 260–272.e8 (2017).
78. Vandoolaeghe, P. & Schuerman, L. Le vaccin antipaludique RTS,S/AS01 chez les enfants âgés de 5 à 17 mois au moment de la première vaccination. *Pan Afr. Med. J.* **30**, (2018).
79. Bell, G. J. *et al.* Case reduction and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine alongside bed nets in Lilongwe, Malawi. *Vaccine* **38**, 4079–4087 (2020).
80. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
81. Kulski, J. K. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and ‘Omic’ Applications. in *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges* (ed. Kulski, J. K.) (InTech, 2016).
82. Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics* **38**, 95–109 (2011).
83. Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 560–564 (1977).
84. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
85. Morozova, O. & Marra, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* **92**, 255–264 (2008).

86. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–1145 (2008).
87. van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).
88. Voelkerding, K. V., Dames, S. A. & Durtschi, J. D. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clin. Chem.* **55**, 641–658 (2009).
89. Oyola, S. O. *et al.* Optimizing illumina next-generation sequencing library preparation for extremely at-biased genomes. *BMC Genomics* **13**, 1 (2012).
90. Miyamoto, M. *et al.* Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes. *BMC Genomics* **15**, (2014).
91. Eid, J. *et al.* Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**, 133–138 (2009).
92. The human genome at ten. *Nature* **464**, 649–650 (2010).
93. DNA Sequencing Costs: Data. *Genome.gov* <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
94. Altmüller, J., Budde, B. S. & Nürnberg, P. Enrichment of target sequences for next-generation sequencing applications in research and diagnostics. *Biol. Chem.* **395**, 231–237 (2014).
95. Teer, J. K. & Mullikin, J. C. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R145–R151 (2010).
96. Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K. & Mardis, E. R. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell* **155**, 27–38 (2013).
97. Lacoste, C. *et al.* Le séquençage d’ADN à haut débit en pratique clinique. *Arch. Pédiatrie* **24**, 373–383 (2017).

98. Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L. & Rice, P. M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1767–1771 (2010).
99. Schubert, M. *et al.* Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics* **13**, (2012).
100. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
101. Matthijs, G. *et al.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 2–5 (2016).
102. Mertes, F. *et al.* Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Brief. Funct. Genomics* **10**, 374–386 (2011).
103. Gardner, M. J. *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498–511 (2002).
104. Hoffman, S. L., Subramanian, G. M., Collins, F. H. & Venter, J. C. *Plasmodium*, human and *Anopheles* genomics and malaria. *Nature* **415**, 702–709 (2002).
105. Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L. & Corbellino, M. BIOLOGY OF HUMAN MALARIA PLASMODIA INCLUDING PLASMODIUM KNOWLESII. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, e2012013 (2012).
106. Krungkrai, S. R. & Krungkrai, J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **9**, 525–534 (2016).
107. Miguel-Oteo, M. *et al.* Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **10**, 299–304 (2017).

108. Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M. & on behalf of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Res.* **39**, D19–D21 (2011).
109. Hertz-Fowler, C. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res.* **32**, 339D–343 (2004).
110. Logan-Klumpler, F. J. *et al.* GeneDB--an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Res.* **40**, D98–D108 (2012).
111. MalariaGEN Plasmodium falciparum Community Project. Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. *eLife* **5**, (2016).
112. Bahl, A. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res.* **31**, 212–215 (2003).
113. Stoeckert, C. J. *et al.* PlasmoDB v5: new looks, new genomes. *Trends Parasitol.* **22**, 543–546 (2006).
114. Aurrecochea, C. *et al.* PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* **37**, D539–D543 (2009).
115. von Mering, C. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* **33**, D433–D437 (2004).
116. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015).
117. Ferdig, M. T. *et al.* Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites: Quinine response QTL in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* **52**, 985–997 (2004).
118. Ecker, A., Lehane, A. M., Clain, J. & Fidock, D. A. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* **28**, 504–514 (2012).

119. Ferreira, A. *et al.* Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. *Cell* **145**, 398–409 (2011).
120. Guiguemde, T. R., Aouba, A., Ouedraogo, J. B. & Lamizana, L. Ten-Year Surveillance of Drug-Resistant Malaria in Burkina Faso (1982–1991). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 699–704 (1994).
121. Jelinek, T. Falciparum Malaria in European Tourists to the Dominican Republic. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 537–538 (2000).
122. Touray, A. O., Mobegi, V. A., Wamunyokoli, F. & Herren, J. K. Diversity and Multiplicity of *P. falciparum* infections among asymptomatic school children in Mbita, Western Kenya. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
123. Alker, A. P. *et al.* dhfr and dhps genotype and sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in children with falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo. *Trop. Med. Int. Health* **13**, 1384–1391 (2008).
124. Ghana. *Severe Malaria Observatory* <https://www.severemalaria.org/fr/pays/ghana>.
125. Ghana country profile - BBC News. <https://www.bbc.com/news/world-africa-13433790>.
126. File:New Ghana Map 2019.jpg - Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/File:New\\_Ghana\\_Map\\_2019.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:New_Ghana_Map_2019.jpg).
127. Asamani, J. A. *et al.* Forecast of Healthcare Facilities and Health Workforce Requirements for the Public Sector in Ghana, 2016–2026. *Int. J. Health Policy Manag.* **7**, 1040–1052 (2018).
128. Awine, T., Malm, K., Bart-Plange, C. & Silal, S. P. Towards malaria control and elimination in Ghana: challenges and decision making tools to guide planning. *Glob. Health Action* **10**, 1381471 (2017).

129. Kain, K. C. & Lanar, D. E. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1171–1174 (1991).
130. Plowe, C. V., Djimde, A., Bouare, M., Doumbo, O. & Wellems, T. E. Pyrimethamine and Proguanil Resistance-Confering Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Polymerase Chain Reaction Methods for Surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**, 565–568 (1995).
131. Tran, T. M. *et al.* A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. *Malar. J.* **13**, (2014).
132. Diallo, A. *et al.* Asymptomatic Carriage of *Plasmodium* in Urban Dakar: The Risk of Malaria Should Not Be Underestimated. *PLoS ONE* **7**, e31100 (2012).
133. U.S. PRESIDENT’S Malaria Initiative. Benin - PMI. <https://www.pmi.gov/where-we-work/benin/>.
134. Charge du paludisme au Benin. *Severe Malaria Observatory* <https://www.severemalaria.org/fr/pays/benin>.
135. Kayentao, K. *et al.* Intermittent Preventive Therapy for Malaria During Pregnancy Using 2 vs 3 or More Doses of Sulfadoxine-Pyrimethamine and Risk of Low Birth Weight in Africa: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* **309**, 594 (2013).
136. Owusu-Boateng, I. & Anto, F. Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a cross-sectional survey to assess uptake of the new sulfadoxine–pyrimethamine five dose policy in Ghana. *Malar. J.* **16**, (2017).
137. Anto, F., Agongo, I. H., Asoala, V., Awini, E. & Oduro, A. R. Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy: Assessment of the Sulfadoxine-Pyrimethamine Three-Dose Policy on Birth Outcomes in Rural Northern Ghana. *J. Trop. Med.* **2019**, 1–10 (2019).

138. Kweku, M. *et al.* Effect of a Malaria Control Program on the Prevalence of Malaria, Fever and Anaemia in Children under Five Years in the Hohoe Municipality of Ghana: A Comparative Analysis of Cross-Sectional Surveys. *Adv. Infect. Dis.* **5**, 180–188 (2015).
139. Walker, P. G. T., Floyd, J., ter Kuile, F. & Cairns, M. Estimated impact on birth weight of scaling up intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy given sulphadoxine-pyrimethamine resistance in Africa: A mathematical model. *PLOS Med.* **14**, e1002243 (2017).
140. Desai, M. *et al.* Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 323–333 (2016).
141. White, N. J. Intermittent Presumptive Treatment for Malaria. *PLoS Med.* **2**, e3 (2005).
142. Maiga, O. M. *et al.* Superiority of 3 Over 2 Doses of Intermittent Preventive Treatment With Sulfadoxine-Pyrimethamine for the Prevention of Malaria During Pregnancy in Mali: A Randomized Controlled Trial. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 215–223 (2011).
143. Biaoou, C. O. A. *et al.* Traitement préventif intermittent à la sulfadoxine-pyriméthamine chez la femme enceinte et effet sur le poids de naissance du bébé: application de la politique à 3 doses en zone urbaine au Sud Bénin en 2017. *Pan Afr. Med. J.* **34**, (2019).
144. Biaoou, C. O. A. *et al.* [Sulfadoxine-pyrimethamine-based intermittent preventive treatment in pregnant women and its effect on birth weight: application of 3-dosing regimen in the urban area of South Benin in 2017]. *Pan Afr. Med. J.* **34**, 155 (2019).
145. Henry, M., Florey, L., Youll, S. & Gutman, J. R. An analysis of country adoption and implementation of the 2012 WHO recommendations for intermittent preventive treatment for pregnant women in sub-Saharan Africa. *Malar. J.* **17**, (2018).

146. Boateng, E. Y., Anyormi, G. E., Otoo, J. & Abaye, D. A. Drivers of intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy in Ghana: a generalized linear model with negative binomial approach. *Appl. Inform.* **5**, (2018).
147. Chico, R. M., Chaponda, E. B., Ariti, C. & Chandramohan, D. Sulfadoxine-Pyrimethamine Exhibits Dose-Response Protection Against Adverse Birth Outcomes Related to Malaria and Sexually Transmitted and Reproductive Tract Infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **64**, 1043–1051 (2017).
148. Mace, K. E. *et al.* Evaluation of sulphadoxine-pyrimethamine for intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a retrospective birth outcomes study in Mansa, Zambia. *Malar. J.* **14**, (2015).
149. Mlugu, E. M., Minzi, O., Kamuhabwa, A. A. R. & Aklillu, E. Prevalence and Correlates of Asymptomatic Malaria and Anemia on First Antenatal Care Visit among Pregnant Women in Southeast, Tanzania. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020).
150. Kidima, W. & Nkwengulila, G. *Plasmodium falciparum msp2* Genotypes and Multiplicity of Infections among Children under Five Years with Uncomplicated Malaria in Kibaha, Tanzania. *J. Parasitol. Res.* **2015**, 1–6 (2015).
151. Quakyi, I. *et al.* High uptake of Intermittent Preventive Treatment of malaria in pregnancy is associated with improved birth weight among pregnant women in Ghana. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
152. Tornyigah, B. *et al.* Effect of Drug Pressure on Promoting the Emergence of Antimalarial-Resistant Parasites among Pregnant Women in Ghana. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, (2020).
153. Moussiliou, A. *et al.* High rates of parasite recrudescence following intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during pregnancy in Benin. *Malar. J.* **12**, (2013).

154. Jiang, T. *et al.* High prevalence of Pfdhfr–Pfdhps quadruple mutations associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar. J.* **18**, (2019).
155. Ruizendaal, E. *et al.* Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malar. J.* **16**, (2017).
156. Capan, M., Mombo-Ngoma, G., Makristathis, A. & Ramharter, M. Anti-bacterial activity of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: comparative in vitro study of sulphadoxine-pyrimethamine, mefloquine, and azithromycin. *Malar. J.* **9**, (2010).
157. Church, J. A., Fitzgerald, F., Walker, A. S., Gibb, D. M. & Prendergast, A. J. The expanding role of co-trimoxazole in developing countries. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 327–339 (2015).
158. Bhattacharyya, M. N. & Jones, B. M. Haemophilus vaginalis infection. Diagnosis and treatment. *J. Reprod. Med.* **24**, 71–75 (1980).
159. Minja, D. T. R. *et al.* Plasmodium falciparum Mutant Haplotype Infection during Pregnancy Associated with Reduced Birthweight, Tanzania. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, (2013).
160. Savic, R. M. *et al.* Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Pregnancy: Optimization of Target Concentrations of Dihydroartemisinin-Piperaquine. *Clin. Infect. Dis.* **67**, 1079–1088 (2018).
161. Esu, E. *et al.* Intermittent screening and treatment with artemether–lumefantrine versus intermittent preventive treatment with sulfadoxine–pyrimethamine for malaria in pregnancy: a facility-based, open-label, non-inferiority trial in Nigeria. *Malar. J.* **17**, (2018).
162. Nair, S. *et al.* Fitness Costs and the Rapid Spread of kelch13 -C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).

163. Balikagala, B. *et al.* Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1163–1171 (2021).