

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP



**ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE
ET DE L'ENVIRONNEMENT**

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2019

Numéro : 201956

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : PARASITOLOGIE

Présentée par :

Cyrille Kouligueul DIEDHIOU

**Étude moléculaire du polymorphisme des gènes
Pfdhfr, *Pfdhps* et de l'évolution de la délétion
en *PfRh2b* chez *Plasmodium falciparum***

Soutenue le 28 Octobre 2020, devant le Jury composé de :

Président	: M. Bhen Sikina	TOGUEBAYE, Professeur titulaire, FST/UCAD
Rapporteurs	: M. Jean-Louis	NDIAYE, Professeur titulaire, UFR Santé/UT
	M. Pierre Yves	MANTEL, Professeur, FSM/UNI-FR (Suisse)
	M. Mbacké	SEMBENE, Professeur titulaire, FST/UCAD
Examineurs	: M. Ambroise	AHOUIDI, PhD Chercheur, HALD/UCAD
	M. Gora	DIOP, Maître-assistant, FST/UCAD
	M. Makhtar	CAMARA, Professeur titulaire, FMPO/UCAD
Directeur de Thèse	: M. Ngor	FAYE, Maître de conférences, FST/UCAD

DEDICACES

Je dédie ce travail,

A ma mère

A mon père

A mes oncles et tantes

A mes Frères et sœurs

A la famille NGANDOUL

A mes cousins et cousines

A mes maîtres

A mes collègues

A mes amis

A l'association AMEED

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux institutions qui m'ont accueilli et soutenu durant cette thèse (laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide LeDantec et l'IRFESSEF).

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés grâce au soutien du financement de la Fondation Bill et Melinda Gates à Dyann F. Wirth, ICEMR, WANETAM et un financement du Conseil européen de la recherche.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Souleymane MBOUP. Je vous adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre Institut (IRFESSEF). Je tiens à vous adresser toute ma gratitude pour le soutien constant, aussi bien financier que moral que vous apportez aux jeunes chercheurs de l'Institut. Recevez ici, cher Professeur, le témoignage de notre profonde gratitude, notre profond respect et notre attachement.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE. Cher maître, nous sommes très touché pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de notre soutenance de thèse. Nous avons bénéficié de vos enseignements de qualité au sein de cette faculté. Vos connaissances scientifiques et immenses qualités humaines n'ont cessé de nous séduire tout au long de notre formation. Veuillez accepter nos sincères remerciements et notre profond respect.

Je remercie le Professeur Jean-Louis NDIAYE d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de notre thèse. Merci pour les commentaires constructifs que vous avez apporté à ce manuscrit afin de l'améliorer. Nous avons une profonde admiration pour vos connaissances scientifiques et vos qualités humaines. Trouvez ici, toute notre reconnaissance ainsi que notre profond respect.

Je remercie le Professeur Pierre-Yves MANTIEL. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et de critiquer de manière constructive ce manuscrit. Votre disponibilité, vos connaissances scientifiques et vos qualités humaines font de vous un chercheur idéal. Veuillez accepter nos hommages respectueux et notre profonde gratitude.

Je remercie le Professeur Mbacké SEMBENE. Cher Professeur, vous nous faites un grand honneur en acceptant d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Vous contribuez, ainsi à la perfection de ce travail et nous vous en sommes très reconnaissant. Votre disponibilité, votre gentillesse et vos immenses connaissances scientifiques nous ont beaucoup marqué. Soyez assuré, cher Professeur, de notre sincère admiration et notre profond respect.

Je tiens à remercier le Professeur Makhtar CAMARA, d'avoir accepté avec enthousiasme d'être membre examinateur dans notre jury. Nous avons une profonde admiration pour vos connaissances scientifiques et vos qualités humaines. Je vous remercie également pour les commentaires constructifs que vous avez apporté à ce manuscrit afin de l'améliorer. Recevez, ici cher Professeur, notre reconnaissance et le témoignage de notre profonde gratitude.

Je tiens à remercier le Docteur Gora DIOF. Vous nous honorez en acceptant d'être membre examinateur dans notre jury. Merci pour les précieux commentaires qui nous ont permis d'améliorer notre manuscrit. Vos qualités scientifiques et humaines font de vous un chercheur exemplaire. Soyez assuré, cher Docteur, de notre sincère admiration et notre profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à notre Directeur de thèse le Professeur Ngor FAYE. Toute ma reconnaissance à vous Professeur, pour avoir accepté de diriger cette thèse malgré vos multiples occupations. Votre disponibilité, vos qualités scientifiques et humaines sont autant de caractères qui forcent le respect et l'admiration. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude, notre profond et respectueux attachement.

J'adresse un très grand merci à notre Encadreur, le Docteur Ambroise AHOUIDI. Cher Docteur, Il nous faut, d'abord, vous remercier d'avoir accepté de diriger cette thèse malgré vos occupations. Homme de grande simplicité, sérieux et respectueux, votre rigueur dans le travail, votre passion de la science, votre esprit critique et votre constante disponibilité sont autant de qualités et de compétences qui vous couronnent dans votre carrière de chercheur. Recevez ici, cher Docteur, le témoignage de notre profonde gratitude, notre profond respect ainsi que notre grande admiration.

Je remercie également le Dr Amy K. Bei pour ses corrections et ses commentaires constructifs. Au-delà de votre compétence, votre disponibilité et votre engagement pour un travail bien fait, forcent l'admiration et le respect. Recevez ici, cher docteur, l'expression de toute notre gratitude.

Je tiens à remercier le Dr Nasserine Papa Mze pour ses corrections, ses commentaires, son soutien et sa disponibilité. Recevez ici, cher docteur, l'expression de toute notre gratitude et notre attachement.

Je remercie tout le personnel de l'Institut de Recherche en santé de surveillance épidémiologique et de formations (IRESSEF). Qu'il trouve, ici toute ma reconnaissance et l'expression du plaisir que j'ai à partager leur quotidien. Un merci tout particulier à Mme Dior Diop MARE pour son soutien, ses conseils et ses encouragements. Sincère reconnaissance et profonde gratitude.

J'adresse mes remerciements à tout le personnel du laboratoire de bactériologie Virologie de l'Hôpital Aristide LeDantec, en particulier, Pr Cheikh Saad Bouh Boye, Pr Halimatou Ndiaye Diop, Dr Mohammed Diallo. Merci pour votre collaboration.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie et mycologie de l'hôpital Aristide LeDantec, particulièrement : Pr Daouda Ndiaye, Pr Aida Badiane, Pr Mouhamadou Ndiaye, Dr Awa Dème, Dr Baba Ndièye, Dr Yaye Dié NDiaye, Dr Aminata Mbaye, Younoussé Diédhiou, Ibrahima M. Ndiaye, Mouhamad Sy, Tolla Ndiaye, Amy gaye. Merci pour votre collaboration.

J'adresse mes sincères remerciements à l'équipe de Harvard particulièrement au Pr Dyann F. Wirth, Pr Manoj Duraisingh, Pr Sarah Volkman. Merci pour votre soutien et votre collaboration. Trouvez ici, toute notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

Je tiens à remercier toute l'équipe du MRC (Medical Research Council) Gambie, en particulier le Dr Alfred Amambua-Ngwa. Merci pour votre accueil, votre disponibilité et votre collaboration.

Je remercie également tous les Professeurs de la Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, UCAD. Nous avons bénéficié de vos enseignements de qualité au sein de cette faculté. C'est le moment pour nous de vous dire Merci et de vous traduire toute notre gratitude et notre profond respect.

Un grand merci à mes parents : Papa, Maman, c'est grâce à vos bénédictions, vos multiples sacrifices que j'ai pu réaliser ce travail. J'espère qu'il pourra faire votre fierté. Vos conseils, vos encouragements, et surtout votre patience m'ont permis d'atteindre ce résultat. Que le bon Dieu vous accorde longue vie afin que vous puissiez jouir du fruit de vos peines. Merci d'avoir su m'écouter et me soutenir dans les moments difficiles. A vous, mon affection et ma gratitude éternelle. Puisse ce modeste travail vous donner une légitime fierté.

Je remercie également mes oncles et tantes. Mention spéciale à David DIEDHIOU. Votre soutien a été sans faille. Vous m'avez soutenu pendant les moments les plus difficiles et m'avez considéré comme un fils à part entière. Ce travail est le fruit de vos efforts conjugués. Soyez assuré de notre sincère admiration, notre profond respect et notre attachement.

J'adresse mes sincères remerciements à mes Frères et sœurs. Votre amour et votre compréhension m'ont toujours aidé. Que les désirs de fraternité et de solidarité familiale qu'ont toujours souhaité nos parents à notre endroit, soit une force afin que nous soyons unies pour toujours. Ce travail est aussi le vôtre, restons toujours solidaires.

J'adresse mes sincères remerciements à la famille NGANDOUL. Mention spéciale à Julie TENDENG. Vous m'avez soutenu pendant les moments les plus difficiles et m'avez considéré comme un fils à part entière. Puisse Dieu vous donner une longue et heureuse vie. Je remercie ses enfants particulièrement Madeleine et Fabienne pour leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements. Recevez ici, toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je remercie également mes cousins et cousines. Que les vœux de solidarité familiale qu'ont toujours faite nos parents, servent d'exemple en chacun de nous, afin que nous soyons toujours soudés. Ce travail est le vôtre.

Je tiens à remercier tous mes amis. "La meilleure façon de recevoir l'amitié est d'en donner" et vous savez le faire. Merci pour les bons moments passé ensemble.

Une petite pensée pour mes compagnons de la faculté des sciences et Techniques de l'UCAD, avec qui j'ai commencé cette aventure biologique et à qui j'adresse tous mes vœux de réussite. Nous avons été unis par ces études restons toujours solidaires. Soyez sûr, je n'oublierai guère aucun de vous. Ce travail est le vôtre.

LISTES DES ABREVIATIONS

ACT : combinaison thérapeutique à base d'artémisinine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ala (A): alanine

AMA 1: Apical Membrane Antigen 1

An : *Anopheles*

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal

Asn (N) : asparagine

BET : Bromure d'éthidium

C : cystéine

Ca²⁺ : Calcium

CD147 : Récepteur Basigine

CPS : Chimio-Prévention du paludisme Saisonnier

CQ : Chloroquine

CR : récepteur du complément

CSP : Protéine Circumsporozoite

DBL : Duffy Binding Like

DGGE : Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant

EBA : *Erythrocyte Binding Antigen*

EBL : *Erythrocyte Binding Like*

EDTA : Ethylenedinitro Tetraacetic Acid

EIR : Taux d'inoculation entomologique

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EXP-1 : Exposed antigen-1

Fe: fer

fg: femtogramme

Fst: Indice de fixation de Wright

G: guanine

Glu (E): acide glutamique

GLURP: protéine riche en glutamate

Gly (G) : glycine

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

G6PD : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase

HLA : antigènes des leucocytes humains

HRM : fusion à haute résolution
HRP2 : protéine 2 riche en histidine
IFI : Immunofluorescence indirecte
Ile (I) : isoleucine
IL-8 : Interleukine 8
IFN- α : Interferon alpha
IFN- γ : Interferon gamma
Kb : kilo paire de base
kDa : kilo Daltons
Km : kilomètre
Leu (L) : leucine
LSA-1 : Liver Stage Antigen-1
LS32 : Light Scanner 32
Lys (K) : lysine
MAF : fréquence d'allèle minoritaire
Mb : Méga base
min : minute
ml : millilitre
MOI : multiplicité des infections
MSP : protéine de surface de mérozoïte
N : Asparagine
n : nombre
NK : Natural killer
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P : *Plasmodium*
PABA : Acide Para Amino Benzoïque
pb : paire de base
PCR : réaction en chaine de polymérase
PCR-RFLP : Réaction de Polymérisation en Chaine suivi du polymorphisme de longueur des fragments de restriction
PEV : Programme Elargi de Vaccination
Pf : *Plasmodium falciparum*
PfCyRPA : *Plasmodium falciparum* cysteine rich protective antigen
Pf $dhfr$: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase

Pfdhps : *Plasmodium falciparum* dihydroptéroate synthétase

PfEMP 1 : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PfRH : *Plasmodium falciparum* Reticulocyte binding protein Homologue

PfRh2b : *Plasmodium falciparum* Reticulocyte Binding Protein Homolog 2b

PfRipr : *Plasmodium falciparum* interacting protein

pH : potentiel Hydrogène

Phe : phényle

pLDH : lactate déshydrogénase de *Plasmodium*

Pm : *Plasmodium malariae*

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

Po: *Plasmodium ovale*

PRG : proguanil

Pv : *Plasmodium vivax*

PV : vacuole parasitophore

PVM : membrane de la vacuole parasitophore

QBC : Quantitative Buffy Coat

R : arginine

RAP1 : Rhoptry Associated Protein 1

RBC : Globules rouges

RESA: Ring infected Erythrocyte Surface Antigen

RH : Réticulocyte Homologue

RON : Rhoptry neck protein

RTS,S : *P. falciparum* CSP

S : seconde

SALSA: Sporozoite Threonine and Asparagine rich Protein

Ser (S) : sérine

SERA5 : Serine Repeat Antigen 5

SLAP : Service de Lutte Antiparasitaire

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SP: sulfadoxine-pyriméthamine

STARP: Sporozoite Threonine and Asparagine Rich Protein

TBE: Tris Borate EDTA

TDR: Tests de Diagnostic Rapide

Thr (T): Thréonine

T_m : Température de fusion

TPI: Traitement Préventif Intermittent

TPI_n : Traitement Préventif Intermittent chez les nourrissons

TPI_p : Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse

TRAP : Trombosin-Related, Adhesive Protein

UV: Ultra-Violet

Val : valine

Y: tyrosine

% : Pourcentage

°C : Degrés Celsius

μl : microlitre

μM : micro molaire

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Principaux foyers de paludisme à <i>P. falciparum</i>	5
Figure 2 : Principaux foyers de paludisme à <i>P. vivax</i>	6
Figure 3 : Principaux foyers de paludisme à <i>P. ovale</i>	7
Figure 4 : Principaux foyers de paludisme à <i>P. malariae</i>	8
Figure 5 : Cycle de vie de <i>Plasmodium sp</i>	11
Figure 6 : Structure du mérozoïte et organelles du complexe apical de <i>P. falciparum</i>	13
Figure 7 : Processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte	14
Figure 8 : Représentation schématique des membres des familles EBA (a) et PfRH (b).....	20
Figure 9 : Cycle de vie des <i>Plasmodium</i> humains et antigènes candidats vaccins	38
Figure 10 : Carte de localisation de la Région de Thiès au Sénégal	39
Figure 11 : Photographie de gel de produit de PCR après digestion du codon S108N du gène <i>Pfdhfr</i> de quelques échantillons	53
Figure 12 : Exemple de profils sauvage, mutant et mixte de quelques échantillons d'ADN au niveau du codon N51I du gène <i>Pfdhfr</i>	54
Figure 13 : Présentation des pics des profils sauvages et mutants du gène <i>Pfdhps</i> 436/437.....	71
Figure 14 : Séquençage de l'échantillon Th050. A : ADN ; B : l'acide aminé	72
Figure 15 : Prévalence de la simple, double, triple, quadruple et quintuple mutation, aux Comores et au Sénégal	72
Figure 16 : Photographie du gel du produit de la deuxième amplification du gène <i>PfRh2b</i> de quelques échantillons	82
Figure 17 : Evolution de la délétion en <i>PfRh2b</i> à Thiès (A) et à Brikama (B).....	85
Figure 18 : Fréquence de la délétion en <i>PfRh2b</i> selon l'âge à Thiès (A) et à Brikama (B).....	87
Figure 19 : Evolution dans le temps de <i>PfRh2b</i> délétion chez les haplotypes "clusters" n'ayant que la délétion en <i>PfRh2b</i> à Thiès	95
Figure 20 : Prévalence des allèles du gène <i>PfRh2b</i> (<i>PfRh2bdel</i> et <i>PfRh2bfull</i>) dans certains sous-groupes haplotype "cluster" et dans le groupe "uniques" chez des isolats de Thiès.....	95
Figure 21 : Prévalence des allèles du gène <i>PfRh2b</i> (<i>PfRh2bdel</i> et <i>PfRh2bfull</i>) par an au niveau des haplotypes "clusters"4 et 16 et la fréquence de ces haplotypes dans la population d'étude..	97

**LISTES DES
TABLEAUX**

Tableau I : Programme et volume réactionnel de la première et deuxième amplification du gène <i>Pfdhfr</i>	46
Tableau II : Conditions de digestion du codon 51 à la suite de la PCR nichée	47
Tableau III : Conditions de digestion du codon 59 à la suite de la PCR nichée	47
Tableau IV : Conditions de digestion du codon 108 à la suite de la PCR nichée	47
Tableau V : Séquences des amorces et des sondes de la HRM	49
Tableau VI : Volume réactionnel du mélange d'amorces et de sonde	50
Tableau VII : Volume du mélange réactionnel	50
Tableau VIII : Programme de la réaction HRM	50
Tableau IX : Prévalence des allèles du gène <i>Pfdhfr</i> au niveau des codons N51I, C59R et S108N à partir d'isolats collectés au Sénégal et en Tanzanie en utilisant la PCR-RFLP et la HRM.....	56
Tableau X : Prévalence des mutations au niveau des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> au Sénégal et en Tanzanie en fonction de la clonalité	58
Tableau XI : Prévalence des mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> au Sénégal et en Tanzanie en fonction du nombre d'allèles par échantillon	59
Tableau XII : Prévalence de la simple, double, triple, quadruple et quintuple mutation au Sénégal et en Tanzanie	60
Tableau XIII : Nombre de TDR ayant donné un résultat positif ou négatif après extraction.....	68
Tableau XIV : Programme et volume réactionnel de la première et deuxième amplification du gène <i>PfRh2b</i>	80
Tableau XV : Résultats du génotypage du gène <i>PfRh2b</i> à Thiès et à Brikama	83
Tableau XVI : Fréquences des allèles utilisées pour calculer <i>Fst</i> en fonction des années	88
Tableau XVII : Prévalence des allèles du gène <i>PfRh2b</i> , des haplotypes "clusters" et des codes-barres "uniques" chez les isolats de Thiès	90
Tableau XVIII : Fréquence de la délétion dans chaque "clusters" ayant uniquement la délétion au cours du temps	93

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE PALUDISME	
I. Epidémiologie du paludisme.....	4
I.1. Agent pathogène.....	4
I.1.1. Classification et répartition des espèces plasmodiales.....	4
I.1.1.1. <i>Plasmodium falciparum</i>	4
I.1.1.2. <i>Plasmodium vivax</i>	5
I.1.1.3. <i>Plasmodium ovale</i>	6
I.1.1.4. <i>Plasmodium malariae</i>	7
I.1.1.5. <i>Plasmodium knowlesi</i>	8
I.1.2. Cycle évolutif et biologique de <i>Plasmodium</i>	9
I.1.2.1. La phase sexuée chez l’anophèle.....	9
I.1.2.2. La phase asexuée chez l’homme.....	9
I.1.3. Les différents stades parasitaires.....	11
I.1.3.1. Le stade anneau.....	11
I.1.3.2. Le stade trophozoïte	12
I.1.3.3. Le stade schizonte.....	12
I.1.3.4. Le stade gamétocyte.....	12
I.1.4. Le processus d’invasion de l’érythrocyte par le mérozoïte.....	13
I.1.4.1. Le mérozoïte	13
I.1.4.2. L’invasion de l’érythrocyte par le mérozoïte	14
I.2. Les vecteurs et le mode de transmission.....	20
II. Diagnostic biologique du paludisme.....	21
II.1. Le diagnostic direct.....	21
II.1.1. La goutte épaisse et le frottis mince	21
II.1.2. Le "Quantitative Buffy Coast"	22
II.1.3. La réaction de polymérisation en chaîne	22
II.1.4. La fusion à haute résolution ou "High Resolution Melting".....	22
II.1.5. Les Tests de Diagnostic Rapide.....	24
II.2. Le diagnostic indirect.....	24
II.2.1. L’immunofluorescence indirect.....	24
II.2.2. L’ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	25
III. Traitement du paludisme.....	25
III.1. Les schizonticides	25

III.1.1. Les amino-4-quinoléines et les amino-alcools.....	26
III.1.2. Les dérivés de l'artémisinine.....	26
III.1.3. Les antifolates.....	26
III.1.3.1. Les antifoliques	26
III.1.3.2. Les antifoliniques	26
III.1.3.3. La sulfadoxine-pyriméthamine	26
III.2. Les gamétocytocides	28
IV. La résistance aux antipaludiques	28
IV.1. La résistance à la pyriméthamine	29
IV.2. La résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine	29
IV.2.1. Les gènes impliqués dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine	29
IV.2.1.1. Le gène <i>P. falciparum</i> dihydrofolate réductase	29
IV.2.1.2. Le gène <i>P. falciparum</i> dihydroptéroate synthétase.....	29
IV.2.2. Les mécanismes de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine.....	30
IV.2.2.1. Les mutations du gène <i>Pfdhfr</i>	30
IV.2.2.2. Les mutations du gène <i>Pfdhps</i>	30
V. Le génome de <i>Plasmodium falciparum</i>	30
V.1. La composition et l'organisation du génome.....	31
V.2. Le Polymorphisme génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	31
V.2.1. Le polymorphisme chromosomique.....	31
V.2.2. Le polymorphisme allélique.....	32
V.2.3. Le polymorphisme antigénique.....	33
V.2.4. Le polymorphisme de nucléotide.....	33
VI. L'immunité antipalustre.....	34
VI.1. L'immunité innée.....	34
VI.2. L'immunité acquise.....	35
VII. L'approche vaccinale	35
VII.1. Les différents types de vaccins.....	36
VII.1.1. Vaccins contre le stade pré-érythrocytaire.....	36
VII.1.2. Vaccins contre le stade érythrocytaire.....	36
VII.1.3. Vaccins bloquant la transmission	37
VII.2. Les antigènes candidats vaccins.....	37

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE THESE

CHAPITRE I : PRESENTATION DES ETUDES REALISEES.....	39
CADRE DE L'ETUDE.....	39
ARTICLE N°1.....	41
Introduction.....	42
I. Matériel et méthodes.....	44
I.1. Population d'étude.....	44
I.2. Collecte des échantillons.....	44
I.3. Extraction de l'ADN parasitaire.....	44
I.4. Génotypage du gène <i>Pfdhfr</i> par PCR-RFLP.....	45
I.5. Génotypage des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> par "High Resolution Melting".....	48
I.6. Génotypage des gènes <i>msp 1</i> et <i>msp 2</i> par PCR nichée.....	51
I.7. Analyses statistiques	52
II. Résultats.....	53
II.1. Résultats de la PCR-RFLP.....	53
II.2. Résultats de la HRM.....	54
II.3. Comparaison entre PCR-RFLP et HRM	55
II.4. Prévalence des mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> par HRM au Sénégal et en Tanzanie.....	57
III. Discussion	61
Conclusion	64
ARTICLE N°2	65
Introduction.....	66
I. Matériel et méthodes.....	67
I.1. Sites d'étude et de collecte des échantillons.....	67
I.2. Tests de diagnostics rapides et extraction de l'ADN parasitaire.....	67
I.3. Génotypage des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> par "High Resolution Melting".....	67
I.4. Séquençage d'ADN	67
I.5. Génotypage des allèles des gènes <i>msp 1</i> et <i>msp 2</i>	67
I.6. Analyses statistiques	68
II. Résultats	68
II.1. Résultats de l'analyse de l'ADN extrait à partir des TDR.....	68
II.2. Prévalence des mutations des gènes <i>Pfdhfr</i> et <i>Pfdhps</i> à Thiès et en Grande Comore.....	69

II.3. Résultats du génotypage des gènes <i>msp 1</i> et <i>msp 2</i>	73
III. Discussion.....	74
Conclusion	75
ARTICLE N°3	76
Introduction.....	77
I. Matériel et méthodes.....	79
I.1. Sites d'étude et collecte des échantillons.....	79
I.2. Extraction d'ADN	79
I.3. Génotypage des allèles du gène <i>PfRh2b</i>	79
I.4. Génotypage des SNP par la méthode "barcoding".....	80
I.5. Analyses Statistiques.....	81
II. Résultats	82
II.1. Résultats de la PCR semi-nichée.....	82
II.2. Evolution de la prévalence de la délétion en <i>PfRh2b</i> chez des isolats de terrain provenant de Thiès et de Brikama.....	83
II.3. Prévalence de la délétion en <i>PfRh2b</i> selon l'âge à Thiès et à Brikama.....	86
II.4. Différenciation temporelle du polymorphisme en <i>PfRh2b</i> chez des populations de parasites du Sénégal et de la Gambie.....	88
II.5. Prévalence de la délétion en <i>PfRh2b</i> chez les isolats regroupés selon le code-barres moléculaire.....	89
III. Discussion.....	98
Conclusion	99
CHAPITRE II : DISCUSSION GENERALE.....	100
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	106

INTRODUCTION

GENERALE

Le paludisme est l'une des maladies les plus répandues dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 228 millions de cas et 405 000 décès sont estimés dans le monde en 2018. La région Afrique de l'OMS enregistre à elle seule 93% des cas et 94% des décès (WHO, 2019). Les couches payant un lourd tribut à la maladie sont les enfants âgés de 0 à 5 ans et les femmes enceintes.

Cependant, sous l'effet de l'amélioration conjointe de la lutte antivectorielle, en particulier de la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, l'utilisation des Tests de Diagnostic Rapide (TDR), des traitements efficaces par les combinaisons à base de dérivés d'artémisinine (ACT) et des Traitements Présomptifs Intermittents (TPI), le paludisme a régressé dans le monde. D'après les estimations, entre 2010 et 2018, la baisse du nombre de cas de paludisme est estimée à 23 millions et celle des décès à 180 000. De même, dans la région Afrique de l'OMS, le nombre de cas aurait diminué de 5 millions et celui des décès de 153 000 (WHO, 2019).

Au Sénégal, le paludisme est endémique et représente actuellement 3% des motifs de consultation. En 2017, 395 706 cas de paludisme ont été confirmés et 284 personnes sont décédées de cette maladie. Cependant, la morbidité proportionnelle palustre est passée de 5,40 % en 2013 à 3,26% en 2017 soit une réduction de 40%. De même, la mortalité proportionnelle palustre est passée de 7,50% en 2013 à 1,73% en 2017 soit une réduction de 77% dans la population générale (PNLP, 2018).

En effet, des plans stratégiques de lutte contre le paludisme ont inscrit dans leurs activités prioritaires la surveillance de l'efficacité des antipaludiques et la prise en charge correcte des cas reposant sur l'administration de molécules antipaludiques efficaces et accessibles. Comme dans la majorité des pays d'endémie palustre, la chloroquine (CQ) était pendant des décennies le traitement de choix contre les accès palustres simples au Sénégal. Malheureusement, des cas de résistance *in vivo*, par rapport à la molécule, apparurent, d'abord, en Asie avant de s'étendre en Afrique et plus tard en Amérique. La hausse des taux de résistance à la CQ a conduit le Sénégal à changer la CQ par la sulfadoxine-pyriméthamine/amodiaquine en 2003 dans le cadre de la chimio-prévention du paludisme saisonnier (SMC) (Ndiaye *et al.*, 2009). En effet, la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) est une combinaison de deux principes antifoliques agissant au niveau de deux étapes successives de la voie folique du parasite. La sulfadoxine inhibe le gène de la dihydroptéroate synthétase (*Pfdhps*) alors que la pyriméthamine inhibe le gène de la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) dans la voie folique du parasite. Cette combinaison agit en synergie contre le *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (Sibley *et al.*, 2001 ; Hyde *et al.*, 2005).

Cependant, le développement rapide de résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), suite à son usage à large échelle représentait une menace sérieuse face aux efforts de contrôle du paludisme. Des études ont révélé des mutations génétiques chez les parasites leur conférant une résistance à la SP (Ndiaye *et al.*, 2005 ; Wurtz *et al.*, 2012). Toutefois, la SP reste encore utilisée en Afrique en prévention du paludisme chez les femmes enceintes dans le cadre du TPI comme le recommande l'OMS (WHO, 2009). D'où, une surveillance continue et constante des marqueurs moléculaires de résistance associés à la SP est essentielle.

Malgré les progrès considérables accomplis, l'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques posent un sérieux problème de santé publique. Par conséquent, la mise en place d'autres stratégies de lutte contre le paludisme comme le renforcement des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) et la recherche de vaccins est nécessaire.

Ainsi, plusieurs candidats vaccins préventifs contre les infections à *P. falciparum* et *P. vivax* sont actuellement en développement. Cependant l'un des obstacles à la mise au point de ces vaccins est le polymorphisme allélique des antigènes utilisés. Parmi ces protéines, nous avons PfRH2b qui semble jouer un rôle dans le processus de pénétration du mérozoïte dans les érythrocytes. Toutefois, des études antérieures sur cette protéine ont identifié un grand polymorphisme structurel (une délétion de 0,58 kb) dans la région C-terminale du gène *PfRh2b*, présente à une fréquence élevée chez des isolats de terrain de différentes régions d'Afrique (Jennings *et al.*, 2007 ; Lantos *et al.*, 2009 ; Ahouidi *et al.*, 2010). La prévalence de cette délétion a été caractérisée en 2006 pour la première fois au Sénégal. Depuis lors, aucune autre étude, à notre connaissance, n'a essayé de voir si la prévalence de cette délétion a augmenté ou diminué. La compréhension de l'évolution de la prévalence de cette délétion est d'une importance majeure dans l'étude de cette protéine comme potentiel candidat vaccin, car des changements temporels au niveau des fréquences alléliques de *PfRh2b* pourraient affecter l'efficacité du vaccin.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier, non seulement le polymorphisme des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps* associé à la résistance de *P. falciparum* à la SP, mais aussi l'évolution de la délétion du gène *PfRh2b* impliqué dans le processus de pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte en utilisant des échantillons provenant de différents pays avec des niveaux d'endémicités différentes.

Quant aux objectifs spécifiques, ils consistent à :

1. Comparer les résultats du génotypage du gène *Pfdhfr* par la PCR-RFLP et par la HRM, afin d'utiliser la technique la plus sensible pour déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et en Tanzanie ;
2. Evaluer la possibilité de l'extraction de l'ADN à partir des TDR et déterminer les mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et aux Comores ;
3. Caractériser l'évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie, en fonction du temps.

Notre mémoire de thèse de doctorat comporte deux grandes parties : la première est une synthèse bibliographique sur le paludisme ; la seconde présente nos travaux de thèse qui s'articulent sur trois études que nous avons menées, en rapport avec nos objectifs spécifiques.

PREMIERE PARTIE:
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE
SUR LE PALUDISME

I. Epidémiologie du paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire due à la présence et à la multiplication dans le sang du sujet infesté d'hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle infecté du genre *Anopheles*.

L'épidémiologie du paludisme se caractérise par une grande diversité du parasite, du vecteur et des populations à risque. Ceci se traduit par une répartition inégale de la maladie dans les pays et un niveau de vulnérabilité des populations variables selon les caractéristiques sociodémographiques, les conditions climatiques et les facteurs écologiques. Le parasite du paludisme est retrouvé dans tous les pays endémiques et sa prévalence est variable en termes d'intensité suivant les zones géographiques.

I.1. Agent pathogène

I.1.1. Classification et répartition des espèces plasmodiales

L'agent pathogène du paludisme chez l'homme appartient à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoea*, à la sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae*, au genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces plasmodiales couramment reconnues pathogènes chez l'homme. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. En plus de ces espèces, on ajoute désormais le *Plasmodium knowlesi*, espèce zoonotique du singe responsable d'infections humaines à fièvre quarte en Asie du Sud-est (Cox-Singh *et al.*, 2008 ; White, 2008).

Ces espèces se différencient par la zone géographique où elles sévissent, des critères biologiques, cliniques et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques.

I.1.1.1 *Plasmodium falciparum*

Cette espèce a été identifiée en 1897 par William H. Welch. *P. falciparum*, le parasite le plus répandu en Afrique subsaharienne, est à l'origine de la grande majorité des cas graves (90 %) et des décès imputables au paludisme. Il est aussi présent en Amérique latine, en Asie du Sud-Est et en Asie centrale (figure 1). Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. Son évolution se fait d'un seul tenant après une incubation de 7 à 12 jours.

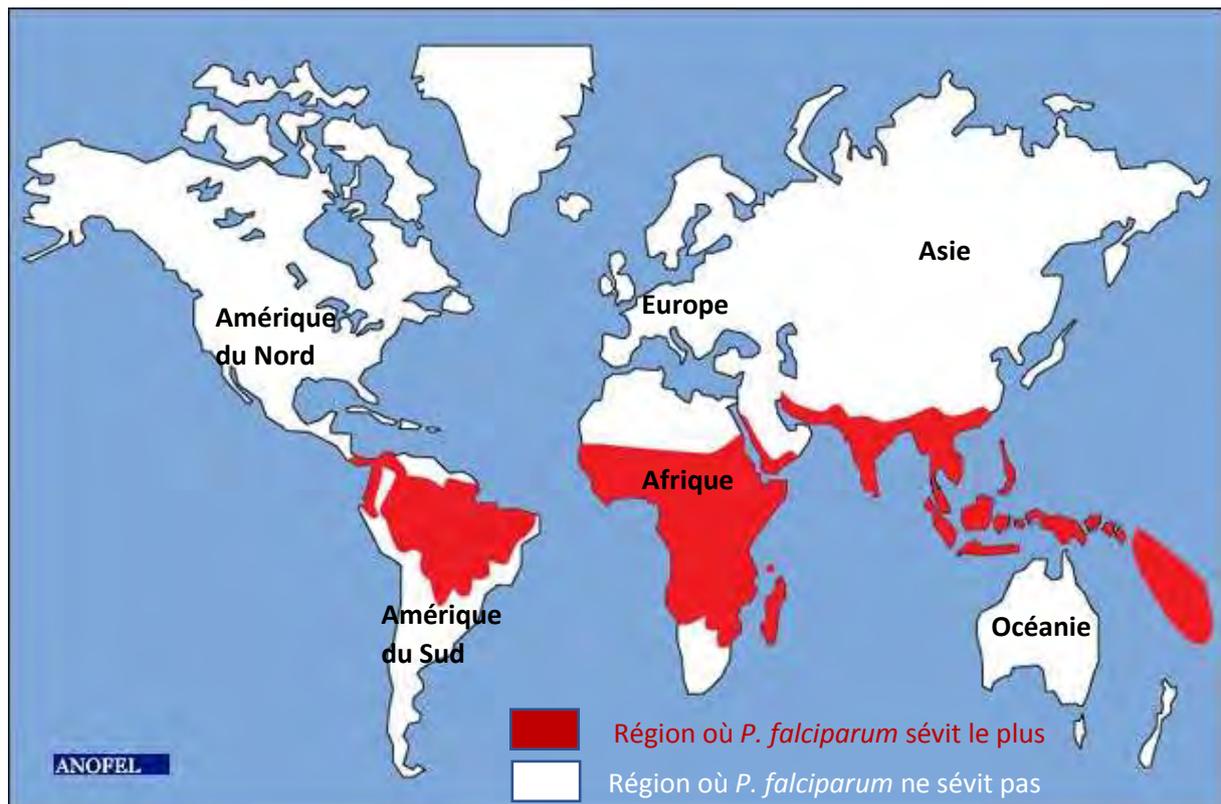


Figure 1 : Principaux foyers de paludisme à *P. falciparum* (ANOFEL, 2014)

I.1.1.2. *Plasmodium vivax*

Elle a été décrite par Giovanni Batista Grassi et Raimondo Filetti en 1890. Cette espèce est surtout présente en Asie, dans certains pays d'Amérique du Sud et centrale, en Afrique du Nord et de l'Est et en Europe (figure 2). Elle est moins présente en Afrique au sud du Sahara. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence) pendant 3 à 4 ans. Elle représente les deux tiers des cas de paludisme dans le monde et le nombre de décès liés à *P. vivax* semble augmenter ces dernières années (Howes *et al.*, 2016).

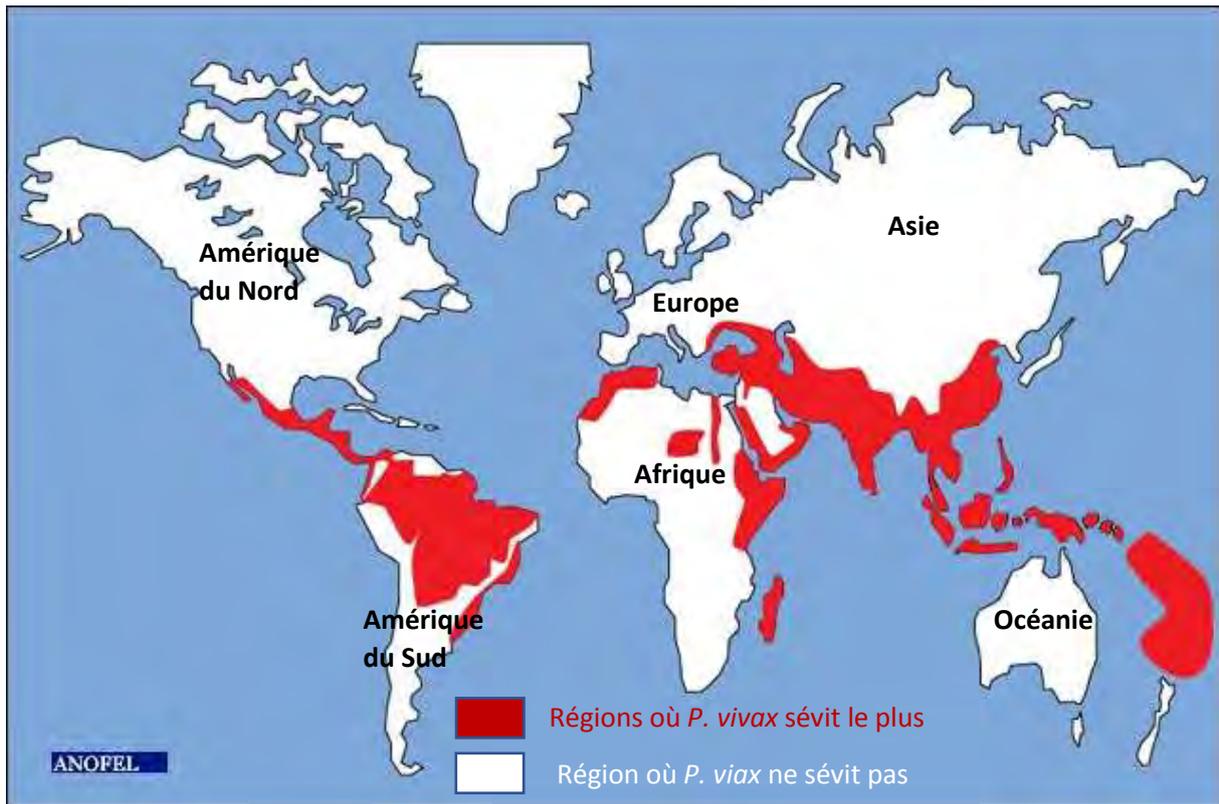


Figure 2 : Principaux foyers de paludisme à *P. vivax* (ANOFEL, 2014)

I.1.1.3. *Plasmodium ovale*

Elle est essentiellement répandue en Afrique de l'Ouest et dans les îles du Pacifique occidentale, et plus rarement en Asie avec des prévalences atteignant au plus 10% (Collins *et al.*, 2005) (figure 3). Les symptômes qu'il provoque sont généralement modérés. Son incubation est de 15 jours au minimum mais il peut persister dans le foie sous forme dormante et provoquer des rechutes tardives (5 ans). Cette espèce a été découverte en 1922 par John William Watson Stephens et est responsable de la fièvre tierce bénigne (Stephens *et al.*, 1922).

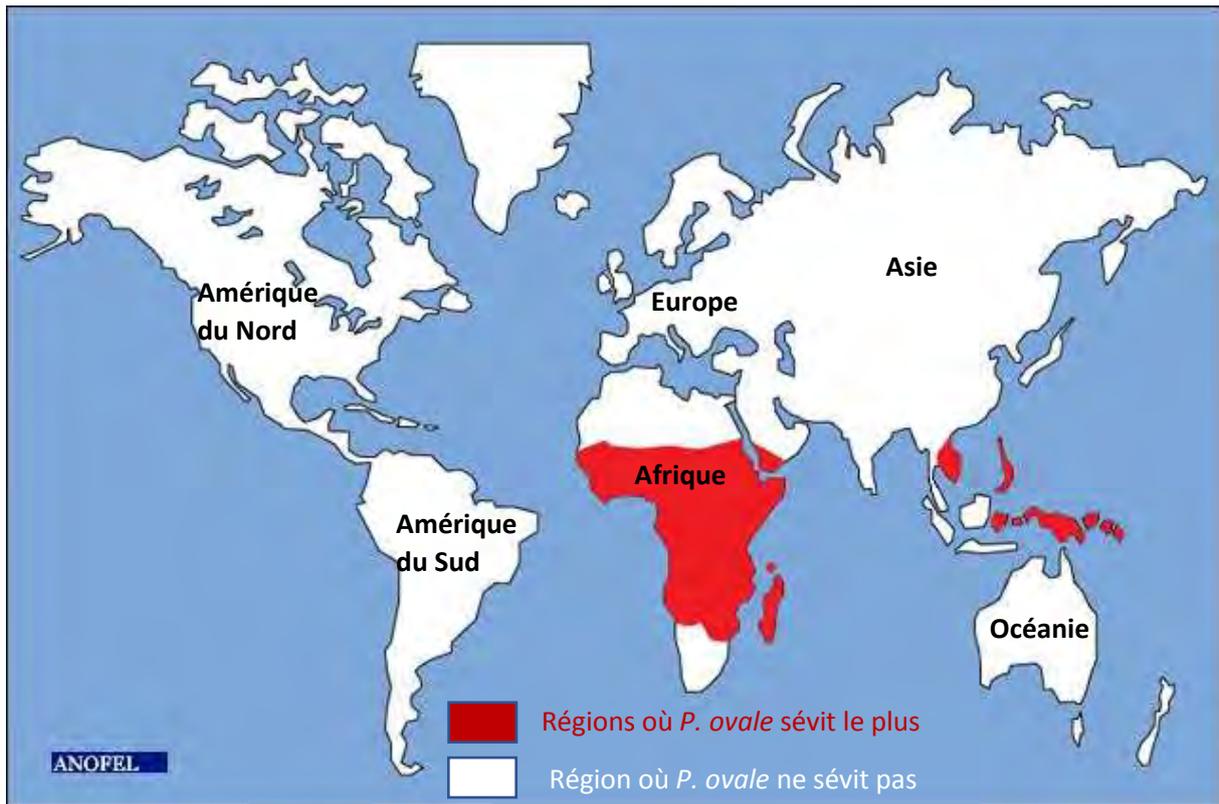


Figure 3 : Principaux foyers de paludisme à *P. ovale* (ANOFEL, 2014)

I.1.1.4. *Plasmodium malariae*

Le paludisme à *P. malariae* a été décrit aussi bien chez l'homme que chez les singes africains par l'italien Giovanni Batista Grassi et Raimondo Filetti en 1890 (Grassi and Filetti, 1890). Cette espèce sévit sur les trois continents tropicaux de manière beaucoup plus sporadique (figure 4). Sa période d'incubation est de 15 à 21 jours et est responsable de la fièvre quarte. Bien que les hypnozoïtes n'ont pas été démontrés pour cette espèce, *P. malariae* peut persister pendant des décennies comme une infection chronique de faible teneur. Ayant une affinité avec les globules rouges âgés, l'infection à *P. malariae* est bénigne mais la conséquence peut être de graves syndromes néphrotiques.

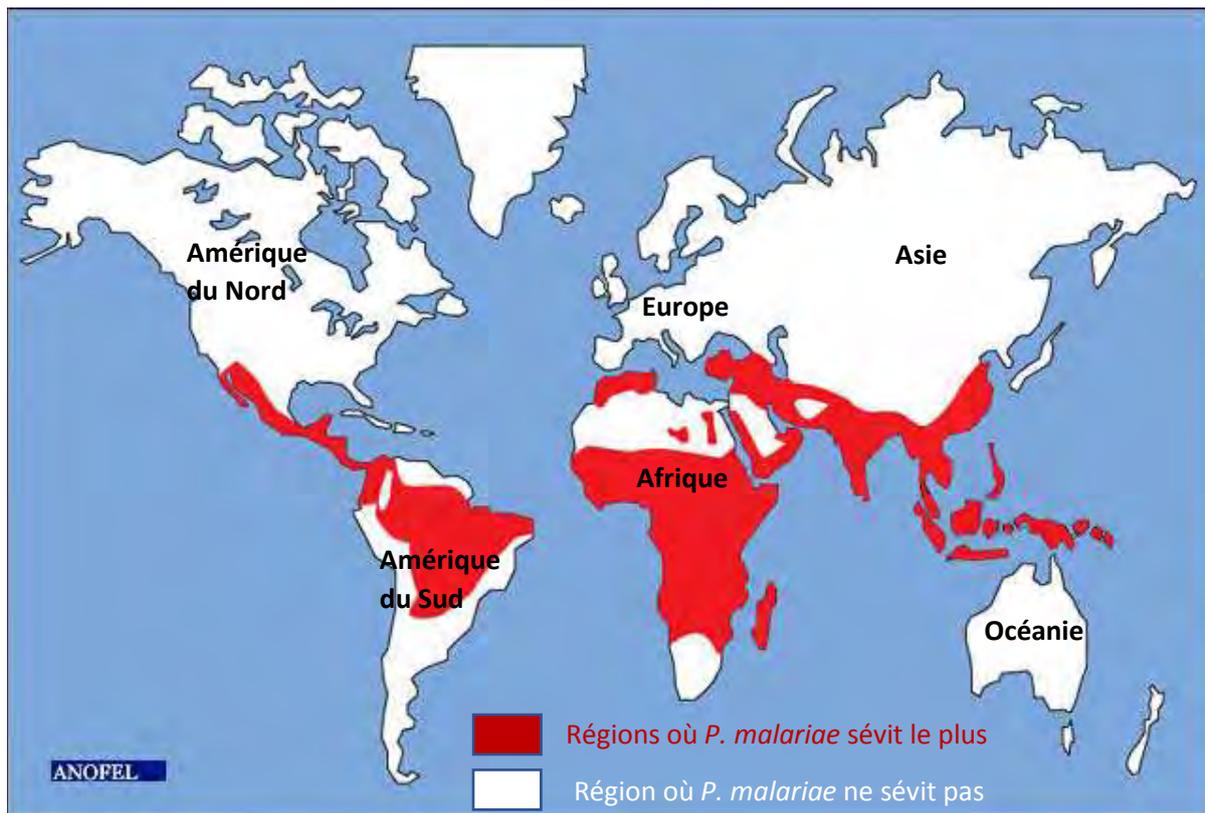


Figure 4 : Principaux foyers de paludisme à *P. malariae* (ANOFEL, 2014)

I.1.1.5. *Plasmodium knowlesi*

Il a été décrit en 1932 par Robert Knowles et Das Gupta (Knowles *et al.*, 1932). Le *Plasmodium knowlesi*, est naturellement présent chez les macaques à longue queue et à queue de cochon qui vivent dans les zones forestières d'Asie du Sud-Est (Cox-Singh *et al.*, 2008 ; White, 2008). Cette espèce peut être transmise des singes à l'homme par la piqûre d'un moustique infecté (*An. leucosphyrus*) (Chin *et al.*, 1968), mais l'infection par *P. knowlesi* était traditionnellement considérée comme une maladie rare, ne se manifestant que sporadiquement chez l'homme.

Le premier cas d'infection naturelle humaine par ce *Plasmodium* a été décrit en 1965, chez un soldat Américain affecté en Malaisie (Chin *et al.*, 1965). Sa période d'incubation est de 24 heures et est responsable d'une fièvre quotidienne. Cependant, la majorité des cas ont ainsi, été signalés en Malaisie, mais la distribution des infections semble plus étendue puisque des cas sporadiques ont été rapportés en Thaïlande (Jongwutiwes *et al.*, 2004), au Myanmar (Cox-Singh *et al.*, 2008), à Singapour (Ng *et al.*, 2008), aux Philippines (Luchavez *et al.*, 2008), au vietnam (Van *et al.*, 2009), et en Chine (Sabbatani *et al.*, 2010). En Europe et aux Etats-Unis, des cas importés, faisant suite à des voyages touristiques ou professionnels en Asie, ont été décrits (Ennis *et al.*, 2009).

I.1.2. Cycle évolutif et biologique de *Plasmodium*

Deux hôtes sont nécessaires à l'accomplissement du cycle : le moustique du genre *Anopheles* (hôte définitif et vecteur) et l'homme (hôte intermédiaire) (figure 5).

I.1.2.1. La phase sexuée chez l'anophèle

Chez l'anophèle femelle, seule hématophage, se déroule un cycle sexué ou sporogonie. Les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin chez un sujet infecté, passent dans l'estomac où ils se transforment en gamètes mâles (par exflagellation) et femelles. La fécondation du macrogamète et du microgamète forme un zygote diploïde. Cette brève phase diploïde est à l'origine de nombreuses recombinaisons méiotiques. Si les deux gamètes ayant fusionné sont issus de clones différents du parasite (en cas de multiparasitisme chez le patient source), ce réassortiment de chromosomes différents produit de nouvelles combinaisons alléliques et, donc, de la diversité ou polymorphisme génétique (Su *et al.*, 2007). Le zygote évolue ensuite rapidement en ookinète qui traverse l'estomac de l'anophèle pour gagner l'hémolymph et s'y transformer en oocyste (Sinden *et al.*, 2001). Ce dernier libère dans l'hémolymph une très grande quantité de sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires, à partir desquelles ils sont prêts à être injectés à l'homme à l'occasion d'une nouvelle piqûre (Craig *et al.*, 1999 ; Mouchet *et al.*, 2004 ; Boutin *et al.*, 2005).

I.1.2.2. La phase asexuée chez l'homme

Le cycle chez l'homme est divisé en deux phases : une phase hépatique ou exo-érythrocytaire (figure 5A) et une phase sanguine ou érythrocytaire (figure 5B).

- **Cycle exo-érythrocytaire**

L'infestation naturelle de l'homme se fait par inoculation des sporozoïtes pendant la piqûre de l'anophèle femelle. L'entrée du parasite dans le foie est un processus dépendant de plusieurs migrations successives à travers deux types cellulaires : l'épithélium et l'endothélium (Miller *et al.*, 2002 ; Frevert *et al.*, 2004). Les parasites ne restent pas plus d'une demi-heure dans le sang, puis vont se réfugier dans les hépatocytes où ils se multiplient dans le cytoplasme en formant de volumineuses cellules plurinucléées, les schizontes hépatocytaires ou corps bleu (figure 5 A3). Après 7 à 15 jours de maturation, celles-ci éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes en fonction des espèces) (figure 5 A4).

Cette période est cliniquement silencieuse et dure en moyenne 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 8-9 jours pour *P. knowlesi*, 9 jours pour *P. ovale* et 13 jours pour *P. malariae*.

Cependant, *P. vivax* (Krotoski *et al.*, 1982) et *P. ovale* (Cogswell *et al.*, 1992) possèdent des formes exo-érythrocytaires appelées les hypnozoïtes, qui peuvent rester quiescentes dans le foie pendant une période qui peut durer cinq ans et produire ensuite des mérozoïtes (Mouchet *et al.*, 2004). Ces formes pourraient être à l'origine des rechutes tardives lors d'infection par ces deux espèces plasmodiales. Par ailleurs, il n'existe pas d'hypnozoïtes dans l'infection à *P. falciparum* et n'ont pas été mis en évidence non plus à l'infection *P. malariae* (Tanomsing *et al.*, 2007 ; Greenwood *et al.*, 2008) et *P. knowlesi*. Les mérozoïtes libérés par les schizontes hépatiques débutent le cycle érythrocytaire.

- **Cycle érythrocytaire**

Les mérozoïtes gagnent la circulation sanguine et pénètrent par invagination dans les globules rouges (figure 5 B5). Chaque mérozoïte se transforme, alors, en un trophozoïte intra-érythrocytaire jeune sous forme d'un anneau cytoplasmique, qui à son tour, grossit et devient âgé présentant un noyau divisé en plusieurs éléments formant une masse plurinucléée, le schizonte sanguin. Celui-ci contient, à maturité, plusieurs mérozoïtes dont le nombre varie selon l'espèce plasmodiale (8 à 32 mérozoïtes chez le *P. falciparum*, 12 à 24 mérozoïtes chez le *P. vivax*, 4 à 16 mérozoïtes chez le *P. ovale* et 8 à 12 mérozoïtes chez le *P. malariae*). Ce schizonte mûr est appelé corps en rosace. Finalement, l'hématie éclate et libère les mérozoïtes qui envahissent de nouveaux globules rouges initiant, ainsi, un nouveau cycle intra-érythrocytaire. L'éclatement des globules rouges, pouvant provoquer l'anémie, est à l'origine de nombreux symptômes cliniques du paludisme. Ce cycle dure 48 heures pour les espèces *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae* et 24 heures pour *P. knowlesi*. Après plusieurs cycles schizogoniques sanguins, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes mâles et femelles (gamétogénèse), qui ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle lors de son repas sanguin (Touray *et al.*, 1992 ; Baker *et al.*, 2010 ; Good *et al.*, 2010).

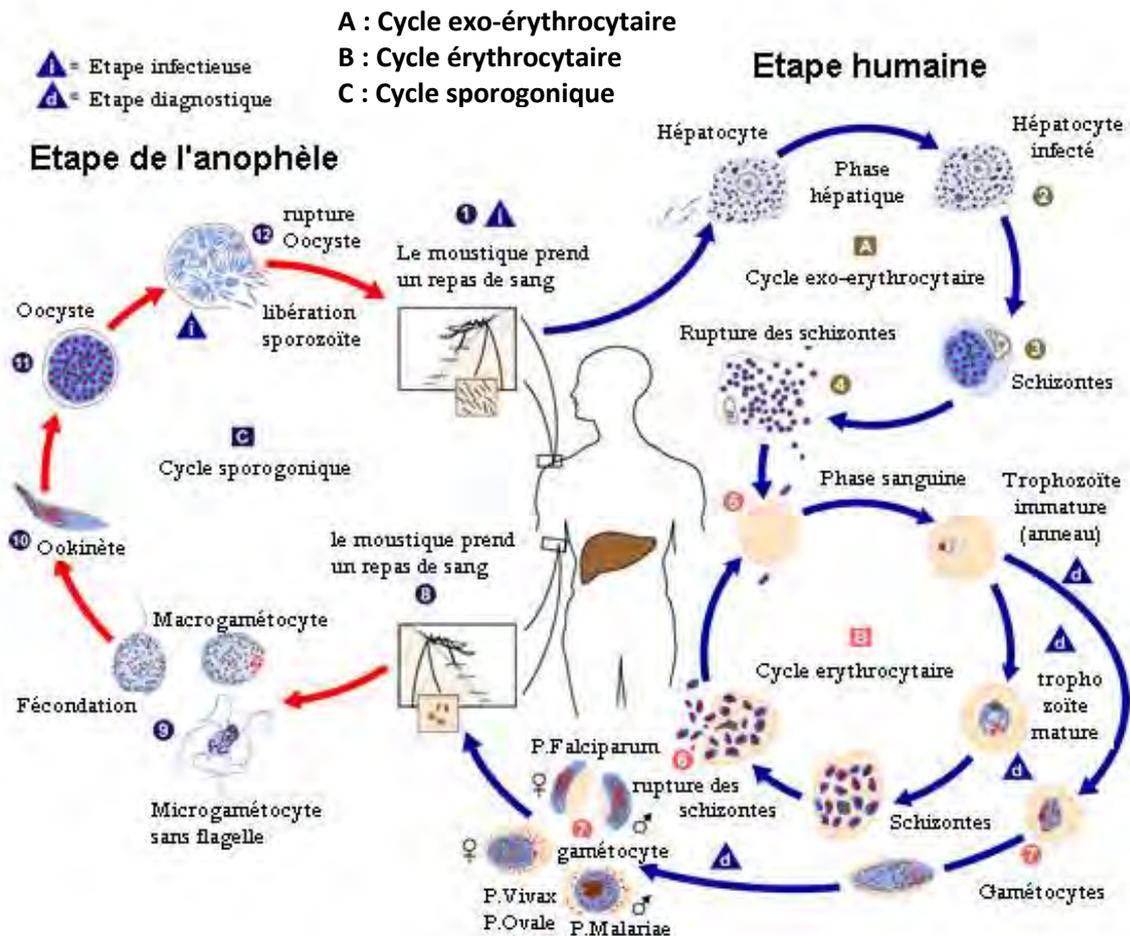


Figure 5 : Cycle de vie de *Plasmodium* sp

Source : http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Malaria_LifeCycle%28French_version%29.GIF

I.1.3. Les différents stades parasitaires

Le parasite peut évoluer au sein de l'hôte, selon plusieurs stades successifs, définis par des critères morphologiques qui diffèrent selon les espèces plasmodiales. Après coloration au Giemsa, différents stades du parasite pourront être observés : le stade anneau, trophozoïte, schizonte et gamétocyte souvent caractéristique.

I.1.3.1. Le stade anneau

A ce stade le parasite est sous la forme d'une « bague à chaton » sur frottis sanguin coloré au giemsa pour l'espèce *P. falciparum*. Cette forme est due au fait que tous les organites majeurs (noyau, mitochondries, apicomplaste, reticulum endoplasmique, ribosomes) sont en périphérie, et que le centre du disque, très fin ne contient que le cytosol (Aikawa *et al.*, 1967). Ainsi, le parasite commence à se nourrir, en dégradant, entre autres, l'hémoglobine de la cellule hôte. Il va se transformer en une forme plus arrondie appelée le trophozoïte.

I.1.3.2. Le stade trophozoïte

Ce stade est caractérisé par un accroissement considérable de l'activité métabolique du parasite qui se manifeste par une augmentation du volume du cytoplasme, de la taille des mitochondries, de l'apicomplaste et le développement d'un appareil de Golgi atypique sous la forme de vésicules périnucléaires (Van *et al.*, 1996 ; Bannister *et al.*, 2000). Le parasite continue à se nourrir en dégradant l'hémoglobine, transforme l'hème toxique, en pigment inerte, l'hémozoïne qu'il accumule dans la vacuole digestive.

I.1.3.3. Le stade schizonte

C'est un stade de divisions nucléaires répétitives, suivies de divisions cytoplasmiques. La digestion de l'hémoglobine se poursuit jusqu'à la fin de ce stade. À maturité, ils prennent la forme de rosace. Celle-ci occupe la totalité de l'hématie parasitée. Les noyaux sont rejetés à la périphérie, le pigment parasitaire est ramassé en amas central. L'éclatement des schizontes mûrs termine le premier cycle schizogonique érythrocytaire en libérant dans le sang les mérozoïtes érythrocytaires capables d'infecter de nouveaux globules rouges. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée : ils se transforment en gamétocytes mâles et femelles.

I.1.3.4. Le stade gamétocyte

L'apparition des gamétocytes a lieu, en général, la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes proviennent de stades sanguins asexués. Ces gamétocytes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. En outre, seul le stade gamétocyte du *Plasmodium* est capable d'établir une infection chez le moustique. Cependant, de nombreux porteurs de gamétocytes ne donnent pas une infection positive chez les moustiques malgré une densité de gamétocytes appropriée (Rutledge *et al.*, 1969). Les gamétocytes mâles et femelles sont discernables par un cytoplasme coloré au Giemsa en rose pâle chez le mâle (avec peu de ribosomes et de mitochondries) et en violet dense chez la femelle (avec beaucoup de ribosomes, d'ARNm et de mitochondries). Après ingestion par le moustique, ces gamétocytes se transforment en quelques minutes en gamètes dus aux changements environnementaux (température, bicarbonate et les facteurs du moustique) (Nijhout *et al.*, 1978). Le gamétocyte mâle, après exflagellation, libère jusqu'à 8 gamètes alors que le gamétocyte femelle se différencie en un unique gamète femelle. Ces gamètes se conjuguent pour donner un œuf mobile appelé ookynète. C'est la phase de reproduction sexuée du parasite.

I.1.4. Le processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte

I.1.4.1. Le mérozoïte

Le mérozoïte, forme libre et invasive des *Plasmodium*, est une petite cellule ovoïde en forme de poire, avec un pôle apical en pointe. Ses dimensions sont variables selon les espèces : sa longueur varie de 1,5 à 2,5 μm et sa largeur de 1 à 2 μm (Bannister *et al.*, 1986). Il est recouvert d'une matrice extracellulaire filamenteuse de 15 à 20 nm d'épaisseur.

Son cytoplasme contient un noyau, des mitochondries, des microtubules et le plastide. Le complexe apical est localisé au niveau du pôle apical et est composé d'organelles impliquées dans le processus d'invasion de la cellule cible : ce sont les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (Aikawa *et al.*, 1978 ; McFadden *et al.*, 1996 ; Sam-Yellow *et al.*, 1996 ; Roos *et al.*, 1999 ; Bannister *et al.*, 2000) (figure 6).

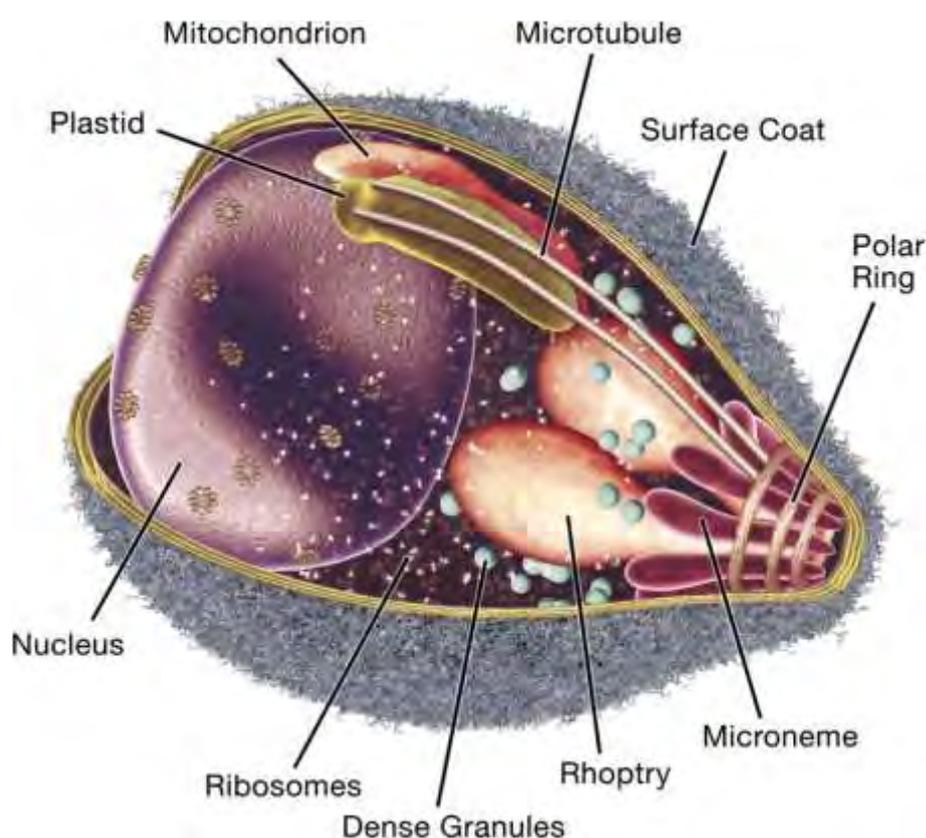


Figure 6 : Structure du mérozoïte et organelles du complexe apical de *P. falciparum* (D'après Cowman *et al.*, 2006).

I.1.4.2. L'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte

L'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte est un processus actif, médié par des interactions moléculaires spécifiques et des événements de transduction de signal entre les récepteurs de l'hôte et les ligands parasitaires (Sam-Yellowe *et al.*, 1996 ; Dubremetz *et al.*, 1998 ; Preiser *et al.*, 2000). Les micronèmes, les rhoptries et les granules denses jouent un rôle important dans l'invasion de la cellule hôte (Cowman *et al.*, 2006). Le contenu de ces organelles est libéré à différents moments du processus et chaque molécule a un rôle précis et différent, permettant l'accomplissement des différentes étapes de l'invasion (Dubremetz *et al.*, 1998). Ainsi, les études utilisant la microscopie optique et électronique ont suggéré que l'invasion des mérozoïtes se réalise en quatre étapes principales que sont : (1) la libération du mérozoïte, (2) Reconnaissance et attachement du mérozoïte à la membrane de l'érythrocyte, (3) Réorientation du mérozoïte et la formation de la jonction serrée, et enfin (4) l'internalisation du parasite (figure 7) (Dvorak *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978; Cowman and crabb, 2006; Gilson and Crabb, 2009).

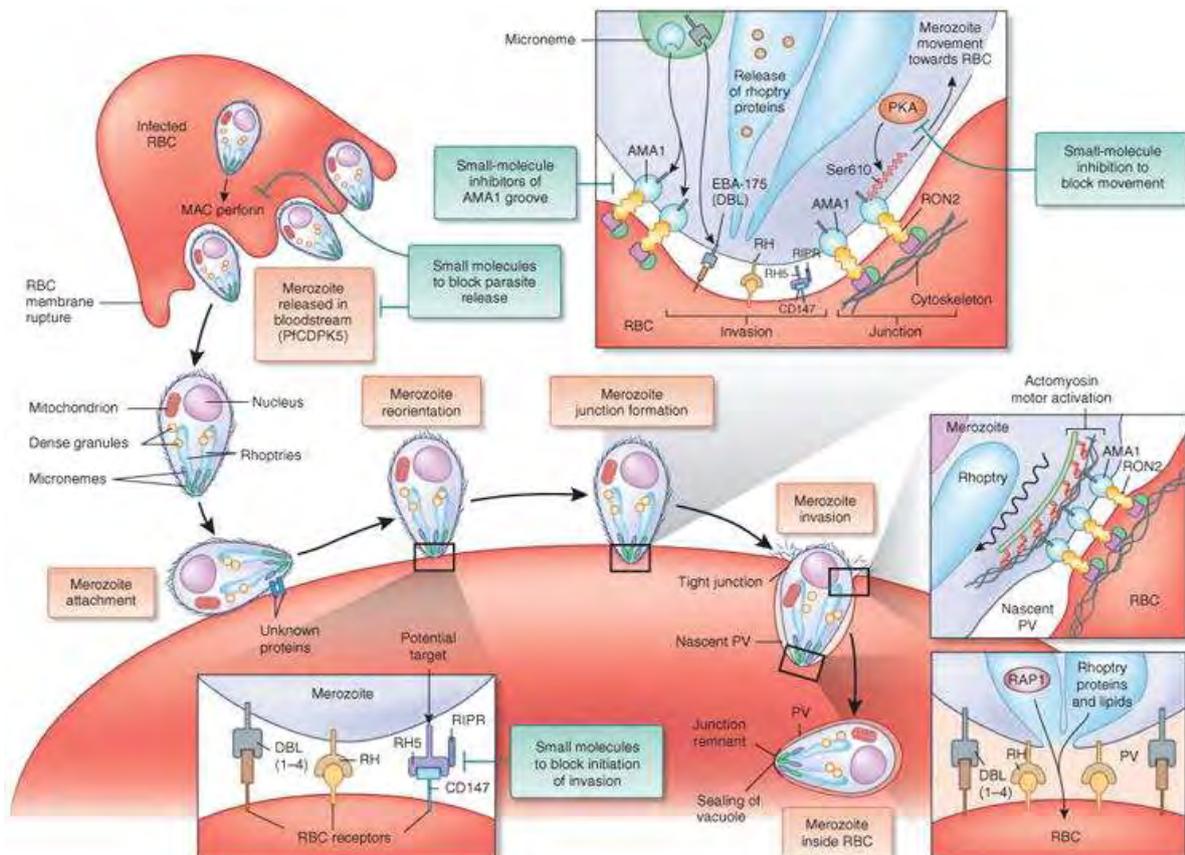


Figure 7: Processus d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte (Miller *et al.*, 2013) RBC=Globules rouges ; RH=ligand Réticulocyte Homologue ; DBL= protéines Duffy Binding Like ; RHP et RH5= protéine interagissant avec le récepteur érythrocytaire (CD147) ; PV= vacuole parasitophore ; AMA 1= protéine Apical Membrane Antigen.

- **Libération du mérozoïte**

La première étape du processus d'invasion, est la libération des mérozoïtes de *Plasmodium*, capables d'interagir efficacement avec l'érythrocyte. Cet événement libère l'agent infectieux d'une demeure expirante afin qu'il puisse pénétrer dans une nouvelle cellule hôte. Cette libération nécessite la rupture de la membrane de la vacuole parasitophore et de la membrane plasmique de la cellule hôte, ainsi que de son cytosquelette sous-jacent (Glushakova *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2007 ; Abkarian *et al.*, 2011). En effet, il a été montré que des activités enzymatiques telles que la sérilprotéase participe à la libération des mérozoïtes (Lyon *et al.*, 1986). En outre, Roggwiler *et al.*, (1997) ont montré que l'urokinase de l'hôte peut également participer à la rupture de l'érythrocyte infecté.

- **Reconnaissance et attachement du mérozoïte à la membrane de l'érythrocyte**

Cette étape est réversible, non spécifique et peut avoir lieu de manière aléatoire sur toute la surface du mérozoïte. En effet, le manteau fibrillaire recouvrant le mérozoïte a des propriétés d'adhérence peu sélectives. Cependant, la présence, sur la surface du globule rouge, de récepteurs spécifiques est indispensable pour que le mérozoïte puisse reconnaître sa cellule hôte. Lors du contact initial, le parasite s'attache aux érythrocytes de l'hôte par des interactions à faible affinité (Bannister *et al.* 1990) par l'intermédiaire de protéines de surface du mérozoïte comme MSP1 (Goel *et al.* 2003 ; Gilson *et al.* 2006). La protéine MSP1, la plus abondamment retrouvée sur la surface du mérozoïte (Gerold *et al.*, 1996 ; O'Donnell *et al.*, 2001 et Goel *et al.*, 2003), conforte l'hypothèse que MSP1 joue un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance et d'attachement. L'étude de Gilson *et al.*, (2006) a estimé qu'elle représente à elle seule, 30% des protéines de surface ancrées par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) au mérozoïte. Il y a plusieurs autres protéines à GPI qui sont supposés prendre part à la médiation du premier contact avec l'érythrocyte : MSP2, MSP4, MSP5, MSP10, Pf12, Pf38, Pf92 et Pf113 (Sanders *et al.*, 2005 ; Cowman and crabb, 2006 ; Gilson *et al.*, 2006). Cependant, certaines protéines comme MSP3, MSP6, MSP7 (Kauth *et al.*, 2003) et SERA5 (la serine repeat antigen 5) (Aoki *et al.*, 2002) sont associées à la surface du mérozoïte par l'intermédiaire de la protéine de surface majeure MSP1. En outre, MSP 1 est censée être impliquée dans le contact initial en se liant au récepteur de surface du globule rouge par l'intermédiaire de la bande 3 et des molécules de type héparine (Boyle *et al.*, 2010 ; Goel *et al.*, 2003). De même, Lin et ses collègues ont identifié un complexe fonctionnel de MSP1 avec MSPDBL1 et MSPDBL2 lequel a été montré de se lier aux globules rouges (Lin *et al.*, 2014).

Par conséquent, le blocage de MSP1, rend la majorité des mérozoïtes incapables de s'attacher aux érythrocytes, ce qui ajoute un poids à son rôle fonctionnel dans l'invasion (Boyle *et al.*, 2010).

D'autres protéines sont aussi utilisées dans les premières étapes de l'invasion de *P. falciparum*. Il s'agit des familles de protéines EBL (*Erythrocyte binding Like*) et PfRH (*Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homologue*) (Gaur *et al.*, 2011). Il a été démontré que ces protéines jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et la détection des cellules hôtes (Gunalan *et al.*, 2013).

- **Réorientation du mérozoïte et la formation de la jonction serrée**

Le mérozoïte oriente sa région apicale contre la surface de l'érythrocyte et les organelles du complexe apical se retrouvent directement apposées à l'hématie. La protéine du micronème AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) peut servir d'intermédiaire dans la réorientation apicale. Il a été montré que des anticorps spécifiques contre AMA1 bloquent la réorientation du mérozoïte (Mitchell *et al.*, 2004).

Après la réorientation, une série d'interactions irréversibles ligand-récepteur d'une grande affinité se met en place entre le parasite et la cellule sanguine se traduisant par la formation de la jonction serrée (Aikawa *et al.*, 1978). En effet, le parasite fournit son propre récepteur pour permettre au mérozoïte d'entrer en contact avec la membrane du globule rouge. Ainsi, les protéines RON2, RON4 et RON5 (Rhoptry neck protein) sont sécrétées par le col des rhoptries et sont localisées au-delà de la membrane plasmique de la cellule hôte où elles pourraient interagir avec le cytosquelette cellulaire (Besteiro *et al.*, 2009). La protéine RON2, insérée dans la membrane plasmique de la cellule hôte interagit avec la protéine AMA1 conduisant, ainsi, à la formation de la jonction serrée (Srinivasan *et al.*, 2011 ; Riglar *et al.*, 2011). La neutralisation de cette interaction empêche le parasite d'envahir le globule rouge et d'établir la vacuole parasitaire. Ce qui suggère que AMA1-RON2 et la formation de la jonction serrée ont un rôle essentiel dans les mécanismes d'invasion de *Plasmodium* (Lamarque *et al.*, 2011 ; Zuccala *et al.*, 2012). Cette jonction se déplace de l'avant vers l'arrière du parasite au fur et à mesure de sa pénétration par invagination. Le mouvement de pénétration est actif et serait régi par le système moteur actine-myosine (Pinder *et al.*, 1998 ; Baum *et al.*, 2008).

Des interactions secondaires sont nécessaires pour compléter le processus d'invasion et impliquent la participation de deux familles de ligands d'invasion : EBL (*Erythrocyte binding Like*) et PfRH (*Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homologue*) (figure 8).

Ces ligands sont localisés à l'extrémité apicale du mérozoïte et leur libération est liée à une augmentation du calcium cellulaire chez les parasites (Singh *et al.*, 2010 ; Gao *et al.*, 2013). Ces protéines semblent travailler en coopération (Lopaticki *et al.*, 2011) et définissent ensemble des voies alternatives pour initier les étapes clés de l'invasion proprement dite. Cependant, les protéines EBL et PfrRH fonctionnent avant la formation de la jonction serrée en fournissant des signaux pour activer l'invasion (Singh *et al.*, 2010 ; Riglar *et al.*, 2011 ; Tham *et al.*, 2015 ; Weiss *et al.*, 2015).

Les membres de la famille EBL se situent dans les micronèmes et comprennent : EBA140 (Adams *et al.*, 2001), EBA175 (Camus *et al.*, 1985), EBA181 (Gilberger *et al.*, 2003), EBA165 (qui est un pseudogène) (Taylor *et al.*, 2002) et EBL-1 (Peterson *et al.*, 2000). Ainsi, des études ont montré que EBA175 interagit avec la glycophorine A (Orlandi *et al.*, 1992 ; Sim *et al.*, 1994 ; Mayer *et al.*, 2001 ; Pandey *et al.*, 2002), EBA140 avec la glycophorine C (Lobo *et al.*, 2003 ; Maier *et al.*, 2003), EBL-1 avec la glycophorine B (Gilberger *et al.*, 2003 ; Gaur *et al.*, 2004 ; Mayer *et al.*, 2009) et EBA181 avec un récepteur sialoglycoprotéine non caractérisé sur la surface des érythrocytes (Mayer *et al.*, 2004) (figure 8). Toutefois, les interactions glycophorine-EBL dépendent des fragments d'acide sialique présent sur les récepteurs érythrocytaires.

La famille des protéines PfrRH est localisée dans les rhoptries et comprend : PfrRH1 (Rayner *et al.*, 2001 ; Triglia *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2008), PfrRH2a (Duraisingh *et al.*, 2003 ; Gunalan *et al.*, 2011), PfrRH2b (Duraisingh *et al.*, 2003) ; PfrRH4 (Kaneko *et al.*, 2002), et PfrRH5 (Hayton *et al.*, 2008 ; Crosnier *et al.*, 2011). PfrRH3 a été montré d'être un pseudogène (Taylor *et al.*, 2001) (figure 8). Les récepteurs potentiels des protéines PfrRH sont moins connus sauf pour PfrRH4 et PfrRH5.

En effet, la protéine PfrRH4 se lie au récepteur du complément 1 (CR1) (Spadafora *et al.*, 2010 ; Tham *et al.*, 2012). Cette interaction sert d'intermédiaire à une voie fonctionnelle (acide sialique-indépendante) pour l'invasion de *P. falciparum* dans les érythrocytes humains. Cette liaison a été montrée d'être sensible à la trypsine et à la chymotrypsine. Des anticorps dirigés contre le domaine de liaison de PfrRH4 sont capable de bloquer l'invasion érythrocytaire (Tham *et al.*, 2012).

PfrRH5, plus petit que les autres membres des protéines PfrRH, ne contient pas de région transmembranaire (Hayton *et al.*, 2008 ; Baum *et al.*, 2009). Cette protéine forme un complexe fonctionnel sur la surface du mérozoïte avec PfrRipr (*P. falciparum* interacting protein) (Chen *et al.*, 2011) et PfCyRPA (*P. falciparum* cysteine rich protective antigen) (Dreyer *et al.*, 2012 ; Reddy *et al.*, 2015) et lie les érythrocytes via le récepteur basigine (ou CD147) de l'hôte.

Ceci, fournit, ainsi, une explication de la façon dont ce ligand d'invasion est ancré à la surface de la membrane plasmique du mérozoïte. L'interaction PfRh5-basigine non redondant (Crosnier *et al.*, 2011), est associée à la libération de Ca^{2+} dans l'érythrocyte, suggérant un pore entre le mérozoïte et l'hôte (Weiss *et al.*, 2015). Par ailleurs, PFRH5 présente un polymorphisme de séquence comparativement faible par rapport aux autres protéines, ce qui permet à des anticorps spécifiques anti-PfRH5 d'inhiber efficacement l'invasion des globules rouges par diverses souches de *P. falciparum* (Douglas *et al.*, 2011 ; Bustamante *et al.*, 2013 ; Patel *et al.*, 2013 ; Reddy *et al.*, 2014). PfRH5, PfRipr et PfCyRPA sont actuellement considérés comme des candidats vaccins car ils induisent des anticorps inhibant l'invasion et sont associés à une protection contre le paludisme (Chen *et al.*, 2011 ; Douglas *et al.*, 2011 ; Dreyer *et al.*, 2012 ; Bustamante *et al.*, 2013 ; Chiu *et al.*, 2014 ; Douglas *et al.*, 2014 ; Douglas *et al.*, 2015 ; Reddy *et al.*, 2015). Il est important de noter que la liaison de PfRH5 à la basigine sur l'érythrocyte est essentielle pour l'invasion des mérozoïtes puisque les parasites de *P. falciparum* ne peuvent pas contourner son utilisation pour l'invasion (Hayton *et al.*, 2008 ; Wanaguru *et al.*, 2013 ; Douglas *et al.*, 2014).

PfRH1 se lie à un récepteur putatif "Y" jusqu'à présent non caractérisé, qui est résistant à la trypsine et à la chymotrypsine et sensible à la neuraminidase (Gao *et al.*, 2008). Une perturbation génétique ciblée des gènes de PfRH1 a entraîné une diminution de la dépendance à l'acide sialique dans l'invasion du mérozoïte. Ceci montre que, PfRH1 joue un rôle direct dans la liaison du parasite au globule rouge et permettrait l'activation du relâchement d'EBA-175 par les micronèmes du parasite. Cette dernière jouerait un rôle complémentaire à PfRH1 en liant des récepteurs différents à la surface du globule rouge (Gao *et al.*, 2013). En effet, la sécrétion d'EBA175 sur la surface du mérozoïte est déclenchée par des signaux calciques (Ca^{2+}) chez le parasite. Cependant, des anticorps monoclonaux contre PfRH1 bloquent l'invasion des mérozoïtes en inhibant spécifiquement la signalisation Ca^{2+} , alors que des anticorps monoclonaux inhibiteurs de l'invasion ciblant EBA175 n'ont aucun effet sur la signalisation calcique (Gao *et al.*, 2013). Ces études montrent en plus que PfRH1 a un rôle de détection initiale et de transduction du signal Ca^{2+} qui conduit à la libération ultérieure d'EBA175 et à la formation de la jonction serrée (Gao *et al.*, 2013).

PfRH2a et PfRH2b, sont identiques pour les 2700 acides aminés N-terminaux et ne diffèrent que par une région C-terminale de 500 acides aminés. Ils sont tous deux situés sur le chromosome 13 et semblent apparaître par duplication génique. Le domaine de liaison de PfRH2a / 2b avec les érythrocytes a été localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Gunalan *et al.*, 2011).

Indépendamment des similitudes entre PfrRH2a et PfrRH2b, ils pourraient être utilisés dans différentes voies d'invasion. Cette capacité est conférée aux domaines cytoplasmiques de PfrRH2a et PfrRH2b (Dvorin *et al.*, 2010).

Le fragment complet de PfrRH2a a été montré d'être sensible à la chymotrypsine tandis que la liaison des deux autres fragments (270 et 140 KDa) était résistante à la neuraminidase, mais sensible aux concentrations croissantes de trypsine et de chymotrypsine. Cela indique que PfrRH2a pourrait utiliser plus d'un récepteur sur la surface des globules rouges (Gunalan *et al.*, 2011). En outre, il a été montré que la région unique de l'extrémité C-terminale de PfrRH2a possède également une certaine activité de liaison aux érythrocytes. PfrRH2a a été localisée à la jonction serrée durant l'invasion (Gunalan *et al.*, 2011).

PfrRH2b est un important ligand d'invasion indépendant à l'acide sialique (Duraisingh *et al.*, 2003). Cette protéine se lie à des récepteurs non caractérisés « Z » sensibles à la chymotrypsine et résistant à la neuraminidase et à la trypsine sur la surface des globules rouges (Duraisingh *et al.*, 2003 ; Gunalan *et al.*, 2013).

Cependant, l'étude d'Aniweh *et al.* (Aniweh *et al.*, 2016) a montré que PfrRH2b est localisée à l'extrémité des rhoptries et qu'elle est étroitement liée à la formation de la jonction serrée durant l'invasion des mérozoïtes. Des anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine inhibent l'invasion des mérozoïtes en bloquant la signalisation des ions Ca^{2+} à l'intérieure du mérozoïte.

Sur le plan clinique, il a été démontré que les anticorps anti-PfrRH2b sont corrélés avec une protection contre les symptômes de la maladie et que ces anticorps augmentent avec l'âge (Dent *et al.*, 2015 ; Crompton *et al.*, 2010).

- **L'internalisation du parasite :**

Durant cette étape, les protéines EBL et PfrRH initient un signal interne dans le mérozoïte qui déclenche la libération du contenu des rhoptries pour l'établissement de la vacuole parasitophore. Des granules denses, libérés par exocytose, fusionnent avec la membrane plasmique du parasite puis déversent leurs contenus, déployant ainsi la membrane de la vacuole parasitophore (PVM) (Torii *et al.*, 1989 ; Chitnis *et al.*, 2000 ; Gaur *et al.*, 2004 ; Cowman *et al.*, 2006). Ainsi, le mérozoïte s'internalise totalement et est entièrement entouré par la PVM. Il a été suggéré que la protéine du micronème AMA1 joue un rôle important dans la sécrétion des rhoptries (Mital *et al.*, 2005), et les événements de signalisation en amont de l'invasion (Treeck *et al.*, 2009 ; Leykauf *et al.*, 2010).

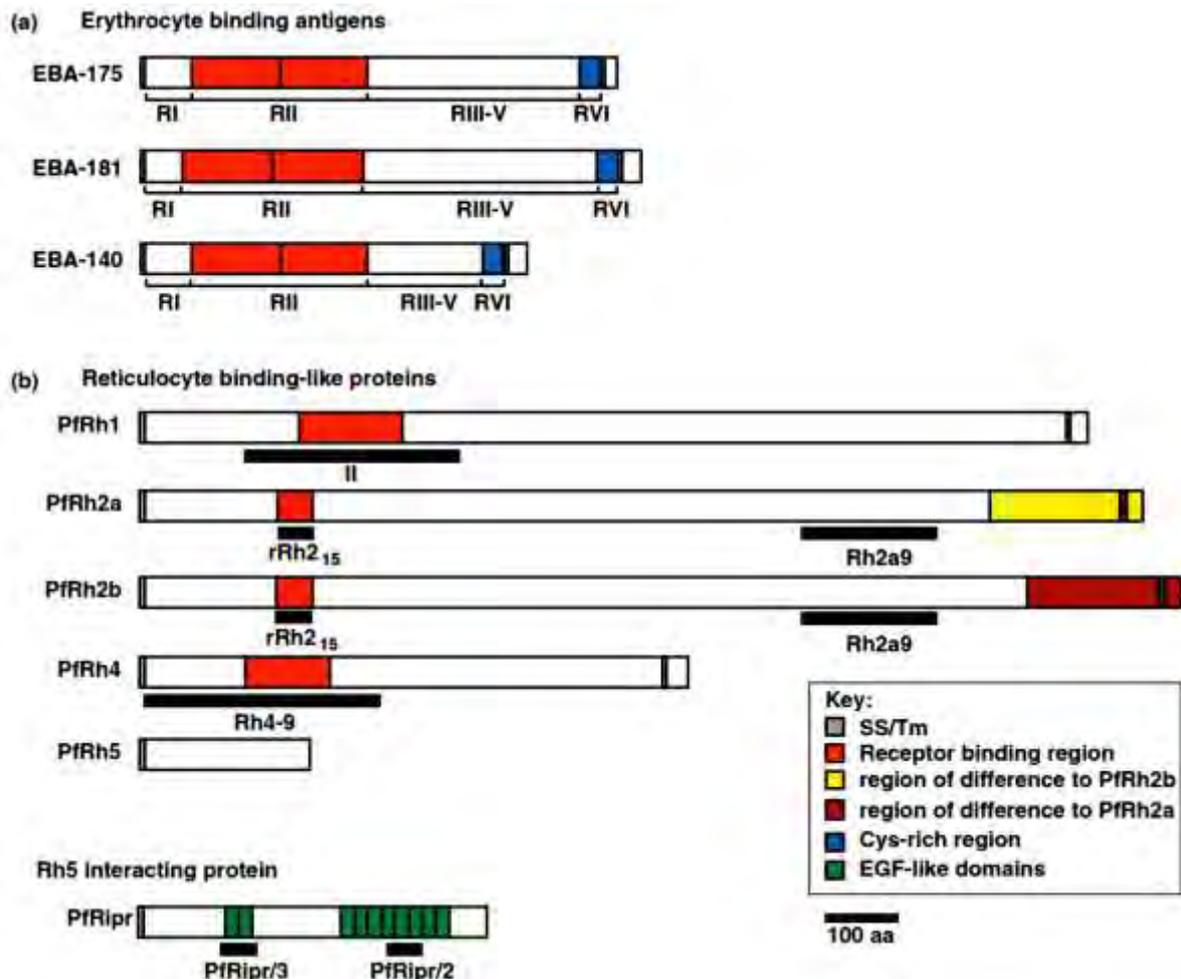


Figure 8 : Représentation schématique des membres des familles EBA (a) et PfRH (b) (Tham *et al.*, 2012)

I.2. Les vecteurs et le mode de transmission

Le paludisme est transmis à l'homme par des moustiques qui sont des insectes diptères nématocères de la famille des *culicidae*, de la sous-famille des *anophelinae* et du genre *Anopheles*. C'est en 1898 que l'italien Giovanni Battista GRASSI a montré que le vecteur du paludisme était un moustique. Seules les femelles sont hématophages et se nourrissent du sang des vertébrés. Ces derniers les attirent par leurs odeurs, leurs couleurs sombres, et le gaz carbonique. L'anophèle femelle pique à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activités entre 23 heures et 6 heures. Sa piqûre est, en général, indolore et son vol le plus souvent silencieux. Sa durée de vie est en moyenne de 45 jours.

Parmi les 400 espèces d'anophèles actuellement décrites, environ une soixantaine sont des vecteurs chez l'homme (Harbach *et al.*, 2004 ; Hay *et al.*, 2010).

En Afrique tropicale, on retrouve 14 espèces d'anophèles vecteurs dont 5 vecteurs principaux : *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles nili*, *Anopheles moucheti* (Mouchet *et al.*, 2004). Selon les espèces, on distingue des anophèles endophiles, exophiles, antropophiles, zoophiles et anthropozoophiles. Certains facteurs climatiques (eau et température), géographiques et environnementaux favorisent le développement du moustique.

Par ailleurs, il existe d'autres modes de contamination : transmission congénitale, transfusionnelle, par greffe d'organes ou par l'intermédiaire de piqûres effectuées avec des aiguilles souillées par le sang de malades impaludés.

Cependant, un diagnostic rapide et précis est crucial pour une bonne prise en charge et une surveillance efficace de la maladie.

II. Diagnostic biologique du paludisme

Ce diagnostic appuie l'évocation clinique, détecte les accès simples et les accès graves du paludisme et évalue les échecs thérapeutiques.

II.1. Le diagnostic direct

Il repose sur la mise en évidence du parasite ou de ces composantes sur un prélèvement de sang périphérique.

II.1.1. La goutte épaisse et le frottis mince

La goutte épaisse est la technique de référence du diagnostic palustre dans les études épidémiologiques préconisées par l'OMS (WHO, 1961). Elle consiste à déposer 3 à 5 µl de sang sur une lame porte-objet, défibriner par un mouvement en spirale à l'aide d'un coin d'une autre lame et ensuite colorer au Giemsa 10%. La lecture se fait au microscope optique à l'objectif x100. Elle permet de détecter des parasitémies faibles de l'ordre de 10 à 20 parasites/µl de sang.

Le frottis mince, est la méthode de référence pour l'étude morphologique des hématozoaires et l'identification des espèces parasitaires. Elle consiste à étaler 1 à 1,5 µl de sang sur 250 à 600 mm² sur une lame porte-objet. Le prélèvement est fixé, puis coloré au Giemsa 10%. Elle est moins sensible que la goutte épaisse avec un seuil de détection de 100 parasites/µl (Dowling *et al.*, 1966 ; Makler *et al.*, 1998).

Cependant, les performances de ces deux examens en termes de sensibilité et de fiabilité dépendent directement du microscopiste et du niveau de parasitémie du sujet infecté.

II.1.2. Le "Quantitative Buffy Coast"

Le principe de cette technique microscopique de fluorescence consiste à centrifuger le tube contenant le sang mélangé à l'acridine orange (fluorochrome capable de se fixer sur le noyau du parasite) (Wardlaw *et al.*, 1983 ; Bair *et al.*, 1992). Il s'agit d'une technique de concentration, très facile à maîtriser, donnant une sensibilité et une spécificité équivalente à celle de la goutte épaisse (Rickman *et al.*, 1989 ; Lowe *et al.*, 1996 ; Craig *et al.*, 1997).

Cependant, le QBC ne permet pas de différencier les espèces plasmodiales, ni d'estimer une densité parasitaire (Lowe *et al.*, 1996).

II.1.3. La réaction de polymérisation en chaîne

Il s'agit d'une technique de biologie moléculaire essentielle pour beaucoup de procédures, telles que le clonage de fragments d'ADN spécifiques, la détection et l'identification de gènes à des fins de diagnostic et en médecine légale. Elle est basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. C'est une technique sensible qui permet de détecter de très faibles parasitémies de l'ordre de 0,3 parasite/ μ l de sang avec une possibilité de quantification de l'ADN plasmodial en utilisant la PCR quantitative (Hänscheid *et al.*, 2002 ; De Monbrison *et al.*, 2003). Cependant, leur temps de réalisation et leur coût ne permettent pas, à l'heure actuelle, de les envisager en diagnostic de routine.

II.1.4. La fusion à haute résolution ou "High Resolution Melting"

L'analyse de fusion à Haute Résolution ou HRM est une technique rapide développée pour l'analyse post-PCR des mutations génétiques ou de la variance dans les séquences d'acides nucléiques. Elle permet de détecter rapidement et de catégoriser les mutations génétiques, par exemple les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP), d'identifier de nouvelles variantes génétiques (analyse génétique), ou de déterminer la variation génétique dans une population (par exemple la diversité virale) avant le séquençage (Zhou *et al.*, 2005).

Elle a trouvé ses premières applications pratiques en biologie moléculaire surtout dans le génotypage des polymorphismes, la découverte de mutations, le dépistage de l'hétérozygotie, les empreintes génétiques, la caractérisation des blocs d'haplotypes, l'analyse de méthylation de l'ADN, la cartographie de l'ADN, l'identification des espèces, l'enquête de la diversité d'une population virale ou bactérienne, le typage dans la compatibilité des antigènes des leucocytes humains (HLA) et les études cas / témoins.

- **Principe de la HRM**

La HRM est une technique utilisée en biologie moléculaire. Elle permet, après une PCR, de différencier, sur une montée en température très progressive (55 - 95°C), les différents variants amplifiés, et ce, avec un simple fluorochrome intercalant.

Cette technique repose sur l'intégration dans l'ADN amplifié par PCR d'un fluorochrome intercalant. Ce colorant est fortement fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et faible à l'état non lié. L'augmentation de température programmée et progressive entraîne une dénaturation de certains fragments du brin d'ADN (domaines de fusion). Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit, donc, une baisse de fluorescence, puis son extinction totale lorsque la dénaturation est complète. Le maximum de diminution de fluorescence est généralement à la température de fusion (T_m) de l'échantillon d'ADN. La T_m est définie comme la température à laquelle 50% de l'ADN est monocaténaire. La T_m d'un produit de PCR est dépendante de sa concentration, de la concentration en sels du milieu dans lequel il est solubilisé mais surtout de sa composition en bases azotées.

A une séquence d'ADN donnée correspond donc, pour une montée en température standard, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Le profil de fusion qui en résulte reflète le mélange d'amplicons présents. Des aspects tels que la teneur en Guanine/cytosine (G/C), la longueur, la séquence et l'hétérozygotie viendront s'ajouter aux caractéristiques de la courbe de fusion pour chaque amplicon (Reed *et al.*, 2007). Ainsi, la T_m est généralement plus élevée pour les fragments d'ADN qui sont plus longs et / ou qui ont une teneur en G/C élevée.

Si la séquence d'ADN analysée comporte des variantes, des mutations, des délétions, la signature change révélant, ainsi, l'existence d'un autre profil, voire d'une anomalie identifiée ou non. La technique HRM permet la détection de ces anomalies avec une sensibilité très élevée. En outre, la quantification des acides nucléiques étant possible avec cette méthode, on peut, ainsi, obtenir une information, à la fois, qualitative et quantitative.

Les sels et autres produits chimiques constituant le kit d'extraction de l'ADN peuvent également affecter les profils de fusion (Applied Biosystems, Inc. (2009) ; il est donc important d'utiliser la même technique pour l'extraction de l'ADN de tous les échantillons et les contrôles.

- **Avantages de la HRM**

La technique HRM peut détecter de nouveaux polymorphismes, la variation du nombre de copies ainsi que les SNP. C'est une méthode simple, rapide, puissante, rentable et peut génotyper avec précision de nombreux échantillons.

- **Inconvénients de la HRM**

La concentration en sel peut avoir un effet sur le pic de la courbe de fusion et ainsi biaiser l'interprétation des données. De plus, la conception d'un nouveau test peut être très coûteuse, du fait du temps nécessaire pour l'optimisation de la technique.

II.1.5. Les Tests de Diagnostic Rapide

Les Tests de Diagnostic Rapide (TDR) reposent sur la migration d'antigènes de *Plasmodium* contenus dans le sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immuno-capture et immuno-marquage. Ils permettent, ainsi, de mettre en évidence l'antigène Histidine Rich Protein 2 (HRP 2), la lactate déshydrogénase (LDH) ou l'aldolase de *Plasmodium* (Kilian *et al.*, 1993).

La protéine HRP 2 est une protéine soluble spécifique de *P. falciparum*. Elle est localisée dans le cytoplasme et sur la surface membranaire de l'érythrocyte infecté. Cette protéine peut être détectée jusqu'à 28 jours après la prise d'un traitement efficace (Karbwang *et al.*, 1996 ; Richter *et al.*, 2004 ; Swarthout *et al.*, 2007).

La protéine pLDH, est une enzyme glycolytique des *Plasmodium*. Elle est utilisée pour détecter les parasites aux stades asexués et sexués. Les anticorps monoclonaux dirigés contre la pLDH peuvent cibler toutes les espèces du paludisme infectant l'homme, mais peuvent être également spécifiques d'espèces (*P. falciparum* ou *P. vivax*) (Makler *et al.*, 1998).

Enfin, l'aldolase est une autre enzyme qui peut être utilisée pour détecter le genre *Plasmodium*, sans différenciation des espèces (Lee *et al.*, 2006 ; Genrich *et al.*, 2007). Ces tests sont simples d'utilisation, spécifiques mais peuvent rester positifs quelques jours après une guérison parasitologique à cause de la persistance de ces antigènes (Singh *et al.*, 1997).

II.2. Le diagnostic indirect

Ces méthodes indirectes mettent en évidence les anticorps circulants chez l'individu. Elles sont utilisées pour connaître le statut sérologique des patients dans le cas des études épidémiologiques mais également lors des dépistages chez les donneurs de sang.

II.2.1. L'immunofluorescence indirecte

Il s'agit d'une méthode sérologique qui permet de mettre en évidence une infection plasmodiale par les stades érythrocytaires. Son principe consiste à incuber une lame (goutte épaisse et / ou frottis sanguin) sensibilisée par un antigène de parasite avec le sérum du patient.

Si ce sérum contient des anticorps spécifiques contre cet antigène le complexe immun persistera après le lavage, et sera fluorescent en lumière ultra-violet grâce au fluorochrome associé aux anticorps. Elle est probablement l'une des méthodes sérologiques les plus sensibles et se positive dès l'accès de primo-invasion (Collins *et al.*, 1968 ; Warren *et al.*, 1975).

Cependant, la détection d'une réponse anticorps par l'immunofluorescence indirecte (IFI) peut persister longtemps, plusieurs années à plusieurs dizaines d'années.

II.2.2. L'ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Cette technique sérologique permet de mettre en évidence une infection plasmodiale sanguine. Elle consiste à fixer sur un support solide des éléments contenus dans le liquide biologique. Ensuite, les antigènes solubles sont détectés à l'aide d'un complexe immun marqué par l'enzyme, et sera révélé par addition d'un substrat spécifique de l'enzyme.

Elle est moins sensible que l'IFI et se positive généralement plus tardivement après un accès primo-invasion (Spencer *et al.*, 1979). Cependant, en l'absence d'infection continue, la détection de la réponse anticorps contre des extraits bruts de schizontes peut disparaître au bout de quelques mois à quelques années.

III. Traitement

Les produits antipaludiques sont destinés à prévenir ou à supprimer l'apparition des symptômes cliniques du paludisme. Toutefois, la décision thérapeutique repose sur l'analyse clinique, le contexte épidémiologique et la confirmation biologique. Il est possible de classer les antipaludiques en fonction de leurs origines (naturelle, synthèse), de leur nature chimique (amino-4-quinoléines, amino-8-quinoléines etc...), et en fonction de leur impact sur l'un des stades du cycle évolutif du parasite (schizonticides, gamétocytocides).

III.1. Les schizonticides

Les schizonticides comprennent des produits à action rapide (amino-4-quinoléines, amino-alcools et dérivés de l'artémisinine) dont le mécanisme de résistance apparaît lentement, et d'autres produits à action lente (antifoliques, antifoliniques) dont la résistance apparaît rapidement. Ces molécules agissent sur les formes endo-érythrocytaires asexuées (trophozoïtes et schizontes).

III.1.1. Les amino-4-quinoléines et les amino-alcools

Ces molécules (chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine) s'accumulent dans la vacuole des plasmodies et modifient le pH vacuolaire qui est maintenu acide par une pompe à protons ATP-dépendante.

Ainsi, elles interviennent dans le métabolisme de l'hémoglobine située au niveau de la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne.

III.1.2. Les dérivés de l'artémisinine

Il s'agit de l'artésunate, de l'artéméter, de la dihydroartémisinine, et de l'arté-éter qui se fixe de façon covalente sur l'hème, formant des dérivés peroxydes de type radicaux libres toxiques pour le parasite, altérant, ainsi, sa structure membranaire. Les dérivés de l'artémisinine ont une action gamétocytocides, qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.

III.1.3. Les antifolates

Ce sont des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique. On distingue les antifoliques (sulfamides et sulfones) et les antifoliniques (proguanil, pyriméthamine).

III.1.3.1. Les antifoliques

Ces molécules préviennent la synthèse de l'acide dihydrofolique nécessaire à la prolifération du parasite. Elles présentent une activité sporonticide chez l'anophèle par blocage de la sporogonie.

III.1.3.2. Les antifoliniques

Les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) qui intervient dans la synthèse des purines et des pyrimidines nécessaires à l'hémozoïne.

III.1.3.3. La sulfadoxine-pyriméthamine

La SP est l'association de deux molécules, à demi-vie longue, agissant au niveau de deux étapes successives de la voie folique du parasite. En effet, les érythrocytes sains sont incapables de synthétiser la purine. Ils incorporent les nucléotides (adénosine) et les purines (adénines, hypoxantine, guanine) présents dans le plasma de l'hôte. Le *Plasmodium* est incapable d'utiliser l'acide folique de l'hôte. Il doit, donc, assurer la synthèse de novo des folates à partir de la PABA (Acide Para Amino Benzoïque).

Ainsi, le parasite, pour survivre, doit modifier, d'une part, la perméabilité membranaire des érythrocytes infectés, ce qui augmente l'influe des purines. D'autre part, il doit fabriquer les enzymes requises pour le cycle de récupération des purines et de synthèse de novo des pyrimidines indispensables pour la synthèse des acides nucléiques (ARN, ADN) et de certains acides aminés. Ainsi, la sulfadoxine inhibe, par compétition avec l'acide para-amino-benzoïque (PABA), l'action de la dihydroptéroate synthétase (DHPS), alors que la pyriméthamine inhibe celle de la dihydrofolate réductase (DHFR) dans la voie folique du parasite (Bzik *et al.*, 1987 ; Warhurst *et al.*, 2002 ; Yuvaniyama *et al.*, 2003). Cette combinaison agit de façon synergétique contre *P. falciparum*. L'action de ce composé s'observe tardivement au cours du cycle intra-érythrocytaire du parasite, au moment du passage du stade trophozoïte âgé au stade schizonte, lorsque la synthèse d'ADN atteint son maximum.

Par ailleurs, la SP est utilisée pour le Traitement Préventif Intermittent (TPI) comme le recommande l'OMS. En effet, le TPI consiste à l'administration de médicaments antipaludiques à des doses thérapeutiques, souvent à une population à risque (femmes enceintes, enfants, nourrissons) indépendamment du fait que la personne soit infectée ou non, à plus d'une occasion, dans l'objectif de prévenir la morbidité ou la mortalité.

- **Traitement Préventif Intermittent chez les femmes enceintes**

Cette stratégie repose sur l'administration à toutes les femmes enceintes vivant dans des zones de transmission stable, au moins, de deux doses de TPI à partir du moment où elles commencent à percevoir les mouvements actifs du fœtus. L'OMS recommande depuis les années 2002 le TPI pendant la grossesse la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIg-SP) à la dose de 3 comprimés en prise unique chez la femme immunocompétente (4^e mois et 7^e/8^e mois) (WHO, 2009). Cependant, depuis octobre 2012, l'OMS recommande que ce traitement préventif soit administré à toutes les femmes enceintes lors de chaque visite de soins prénatale programmée à l'exception du premier trimestre de grossesse (WHO, 2012).

A cause de son innocuité pendant la grossesse, de son efficacité et de sa facilité d'utilisation, la SP est actuellement le médicament le plus utilisé pour le TPI dans toutes les zones d'Afrique où la transmission du paludisme est d'une intensité modérée à sévère. Il est administré par voie orale, en dose unique en présence de l'agent de santé. L'examen des résultats de l'OMS a révélé qu'avec trois doses ou plus de TPIg-SP, on observait un poids moyen à la naissance plus élevé et moins d'enfants ayant un faible poids à la naissance qu'avec deux doses de TPIg-SP (WHO, 2012). De plus, le TPI peut également réduire l'anémie maternelle de manière significative (Shulman *et al.*, 1999 ; Kayentao *et al.*, 2005).

- **Traitement Préventif Intermittent chez les nourrissons**

Le Traitement Préventif intermittent chez les nourrissons (TPIIn-SP) consiste à administrer aux nourrissons de la SP (1/2 comprimé) délivrée en même temps que le Programme élargi de vaccination (PEV) à des intervalles correspondant au calendrier vaccinal habituel. Cette stratégie est appliquée dans les régions où la transmission du paludisme a un caractère saisonnier ou pérenne avec des périodes de forte transmission. Par ailleurs, l'administration des antipaludéens aux enfants de moins de 5 ans à des doses curatives à intervalle mensuel ou bimensuel en ciblant le pic de la transmission, a un impact positif, aussi bien, sur l'incidence du paludisme que sur la sévérité des accès (Aponte *et al.*, 2009).

III.2. Les gamétocytocides

Les gamétocytocides ont une action sur les formes à potentiel sexué, les gamétocytes. Ils agissent en inhibant la transformation des gamétocytes du sang humain en gamètes chez l'anophèle. Ils ont, en outre, une activité sur les formes exo-érythrocytaires tissulaires hépatiques. Ils sont représentés par les amino-8-quinoléines, en particulier, la primaquine.

- **La primaquine**

Cet antipaludique inhibe la dihydro-orotate réductase nécessaire au fonctionnement de l'acide désoxyribonucléique (ADN) plasmodique. Cette molécule est utilisée à grande échelle pour le traitement radical du paludisme à *P. vivax* et *P. ovale* et comme gamétocytocide en dose unique contre le paludisme à *falciparum* (Baird *et al.*, 2004 ; Oliver *et al.*, 2008). Son utilisation offre de grandes possibilités pour réduire la transmission du paludisme à *P. falciparum* dans les zones à faible transmission et peut, donc, prévenir la transmission des formes résistantes à l'artémisinine. Par ailleurs, des études ont montré une résistance de *P. falciparum* à la quasi-totalité des antipaludiques utilisés jusqu'à nos jours (Mombo-Ngoma *et al.*, 2011 ; Das *et al.*, 2013 ; Ariey *et al.*, 2014). Cette résistance résulte d'une élimination tardive ou incomplète des parasites dans le sang du patient alors que celui-ci est sous traitement avec un antipaludique.

IV. La résistance aux antipaludiques

La résistance aux antipaludiques est un phénomène aléatoire résultant de mutations spontanées. Ces mutations ont pour effet de modifier la structure et l'activité, au niveau moléculaire, de la cible du médicament ou de l'empêcher de parvenir à cette cible. La résistance dépend de facteurs qui sont liés aux *Plasmodium*, aux propriétés de chaque antipaludique et, plus accessoirement, aux caractères génétiques de certaines populations.

IV.1. La résistance à la pyriméthamine

La résistance à la pyriméthamine est apparue rapidement après son introduction (Jones *et al.*, 1954 ; Burgess *et al.*, 1959 ; Meuwissen *et al.*, 1961). Des études ont montré que la résistance à la pyriméthamine chez *P. falciparum* était associée à des mutations ponctuelles spécifiques au sein du gène *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (Pfdhfr)* (Peterson *et al.*, 1990 ; Plowe *et al.*, 1998). C'est pourquoi, elle a été, par la suite, utilisée en combinaison avec un sulfonamide, la sulfadoxine. Cependant, leur efficacité a rapidement diminué en raison du développement rapide de la résistance du parasite en Asie contre cette famille de molécules, résistance qui s'est finalement propagée au continent africain (Roper *et al.*, 2004).

IV.2. La résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

La résistance de *P. falciparum* à la SP a émergé très rapidement en Asie dans les années 1960 et en Afrique à la fin des années 1980 (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Elle est liée à des mutations sur les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, responsables d'un changement de conformation de l'enzyme, d'une diminution de l'affinité de la molécule antipaludique et, donc, d'une perte de son activité.

IV.2.1. Les gènes impliqués dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

IV.2.1.1. Le gène *P. falciparum* dihydrofolate réductase

Le gène *Pfdhfr* est situé sur le chromosome 4 et existe sous forme de copie simple. Il a été séquencé en 1987 par l'équipe de Bzik à partir du clone FCR3 de *P. falciparum* originaire de la Gambie et sensible à la pyriméthamine (Bzik *et al.*, 1987). Ce gène a une taille d'environ 1827 paires de bases (pb) et code pour une protéine enzymatique de 607 acides aminés intervenant dans la voie de synthèse des folates. L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au niveau des codons 51, 59, 108 et 164 entraînent la résistance clinique des parasites à l'action des antifolates.

IV.2.1.2. Le gène *P. falciparum* dihydroptéroate synthétase

Le gène *Pfdhps* est localisé sur le chromosome 8 et existe sous la forme de copie simple. Il a été séquencé en 1994 par les équipes de Triglia et de Brooks à partir de clones de 3D7 et de W2 (Brooks *et al.*, 1994 ; Triglia *et al.*, 1994). Ce gène a une longueur d'environ 2121 pb et code pour une protéine enzymatique de 176 acides aminés. L'enzyme DHPS est produite tout au long de la phase asexuée du cycle de développement du parasite. Les mutations se situant au niveau des codons 436, 437, 540, 581 et 613 confèrent une résistance à la sulfadoxine.

IV.2.2. Les mécanismes de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine

IV.2.2.1. Les mutations du gène *Pfdhfr*

Les mutations sur le gène *Pfdhfr* altèrent la structure de la protéine et diminuent son affinité pour la pyriméthamine et le cycloguanil conduisant à une résistance aux inhibiteurs de la DHFR. *Pfdhfr* est le gène qui code la DHFR. La mutation S108N (remplacement de la sérine par une asparagine au niveau du codon 108) du gène de la DHFR est associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (Basco *et al.*, 1995 ; De Pecoulas *et al.*, 1996 ; Sibley *et al.*, 2001; Hyde, 2005). Les mutations additionnelles N51I (remplacement de l'Asparagine par L'Isoleucine, C59R (remplacement de la Cystéine par l'Arginine) ou I164L (remplacement de l'Isoleucine par la Leucine) augmentent cette résistance. L'association des quatre mutations est responsable du niveau le plus élevé de résistance aux antifoliniques et à l'association Sulfadoxine-pyriméthamine.

IV.2.2.2. Les mutations du gène *Pfdhps*

Le rôle essentiel des antifoliniques est de permettre une potentialisation des antifoliniques. La résistance à ces composés est due à une modification de l'enzyme DHPS (Le Bras *et al.*, 1996). L'analyse des séquences du gène de la DHPS montre des différences d'acides aminés entre des souches sensibles et résistantes à la Sulfadoxine (Brooks *et al.*, 1994 ; Triglia *et al.*, 1994). Les mutations S436A ou S436P (remplacement de la Sérine par l'Alanine ou la Phénylène), A437G (remplacement de l'Alanine par la Glycine) et K540E (remplacement de la Lysine par la Glutamate) du gène *Pfdhps* confèrent une résistance à la Sulfadoxine (Wang *et al.*, 1997). La mutation isolée A437G et la double mutation A437G plus K540E sont respectivement associées à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la SP. Les mutations A581G et A613T/S sont rares, en particulier, en Afrique, mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance à la sulfadoxine (Pradines *et al.*, 2010).

V. Le génome de *Plasmodium falciparum*

Le génome de *Plasmodium* est haploïde pendant presque tout le cycle vital, sauf pendant une courte période de diploïdie qui se déroule chez le moustique (formation du zygote) (Walliker *et al.*, 1987). Ainsi, un effort de la communauté internationale a été fait, en 1996, (Hoffman *et al.*, 1997) pour séquencer le génome du clone 3D7 de *P. falciparum* avec l'espoir que le séquençage du génome ouvrirait de nouvelles pistes de recherche.

Entre 1998 et 1999, les chromosomes 2 (Gardner *et al.*, 1998) et 3 (Bowman *et al.*, 1999) ont été entièrement séquencés et publiés. L'ensemble de la séquence des douze chromosomes restants a été rendu disponible en fin 2002 (Gardner *et al.*, 2002).

V.1. La Composition et l'organisation du génome

Le génome nucléaire du clone 3D7 de *P. falciparum* possède une taille de 22,8 méga bases (Mb) et est organisé en quatorze chromosomes dont la taille varie de 0,643 à 3,29 Mb (Goman *et al.*, 1982 ; Walliker *et al.*, 1987 ; Gardner *et al.*, 2002). La composition en nucléotides présente une forte richesse en adénines (A) et en thymines (T), représentant en moyenne 80,6% du génome voir plus de 90% pour les régions intergéniques, télomériques et subtélomériques. Ce génome code pour environ 5300 protéines avec une taille moyenne de 4300 paires de bases (pb). Deux génomes extranucléaires additionnels sont également présents, un mitochondrial de 6 kb et un plastidique de 35 kb.

Ainsi, la compréhension du génome de *P. falciparum* a permis de déceler les caractéristiques de ce parasite à savoir la variabilité et le polymorphisme génétique. En effet, la variabilité génétique concerne les protéines exprimées à la surface des érythrocytes qui sont codés par des gènes ayant plusieurs copies au sein d'un même génome et induisant ainsi une variabilité intense. Le polymorphisme génétique quant à lui concerne les gènes représentés en une seule copie dans le génome et dépend de l'étendue des allèles disponibles et de la reproduction sexuée.

V.2. Le polymorphisme génétique de *Plasmodium falciparum*

Le polymorphisme génétique de *P. falciparum* contribue au phénomène d'échappement du système immunitaire de l'hôte. Ce polymorphisme, observé au niveau chromosomique, allélique, antigénique et nucléotidique, est plus intense dans les régions de forte transmission et faible dans les régions de faible transmission (Gardner *et al.*, 2002). Ces polymorphismes sont importants et rendent difficile la mise en place d'un vaccin.

V.2.1. Le polymorphisme chromosomique

Ce polymorphisme peut être dû à un changement de la structure des chromosomes (délétion, duplication, inversion, translocation) au niveau des régions subtélomériques instables. Cette instabilité est due à la présence des gènes *var* qui n'expriment jamais qu'une seule protéine par un système de commutation mutuellement exclusive (Chen *et al.*, 1998 ; Deitsch *et al.*, 1999).

En plus, la présence dans ces régions instables, de familles d'antigènes dont les membres sont dispersés sur plusieurs chromosomes, augmentent l'instabilité et le potentiel polymorphique de ces régions en permettant des recombinaisons entre chromosomes hétérologues (Hinterberg *et al.*, 1994). En effet, la région subtélomérique de *P. falciparum* contient des motifs conservés répétés, suivis d'un à trois gènes *var* organisés en clusters (kyes *et al.*, 2007). Ces motifs conservés vont faciliter les échanges de matériel génétique des gènes situés à proximité, par des événements de recombinaison allélique ou ectopique durant la méiose et la mitose.

V.2.2. Le polymorphisme allélique

P. falciparum présente un important polymorphisme allélique avec un très grand nombre d'allèles pouvant être regroupés en famille allélique. Par exemple, trois familles alléliques ont été identifiées dans le bloc 2 du gène *msp1* (K1, MAD20, RO33) (Tanabe *et al.*, 1987) et deux familles alléliques dans le bloc 3 ou le domaine répétitif central du gène *msp2* (FC27 et 3D7) (smythe *et al.*, 1990 ; fenton *et al.*, 1991 ; felger *et al.*, 1994). Les gènes *msp1* et *msp2* sont couramment utilisés comme marqueurs pour étudier la diversité génétique, la multiplicité des infections, le niveau de transmission et l'immunité contre le paludisme. Ils constituent également un outil pour distinguer la recrudescence des nouvelles infections des populations de parasites de *P. falciparum* (Cattamanchi *et al.*, 2003 ; Amodu *et al.*, 2008).

En effet, le gène *msp1*, localisé sur le chromosome 9, comporte 17 blocs conservés et variables séparés par des régions semi-conservées ou conservées (Tanabe *et al.*, 1987).

La région N-terminale ou bloc 2 de MSP1 est une région hautement polymorphe avec de nombreuses séquences de variantes connues à partir d'isolats parasitaires globalement divers (Miller *et al.*, 1993 ; Jiang *et al.*, 2000).

Le gène *msp2* situé sur le Chromosome 2 est composé de 5 blocs. Il est l'un des gènes les plus polymorphes du mérozoïte. En effet, ce gène comporte une séquence 5' et 3' fortement conservée (N et C terminal) flanquée par une région variable centrale. Cette région variable a des répétitions de séquence flanquées par des séquences dimorphiques non répétitives (fenton *et al.*, 1991 ; Felger *et al.*, 1994). Cependant, le polymorphisme allélique, n'est pas seulement restreint aux mutations ponctuelles isolées. Les échanges génétiques jouent également un rôle important dans la diversification. Par exemple, les gènes de classe I semblent échanger de courtes séquences (10-15 nucléotides), source de nouveaux allèles (Parham *et al.*, 1995).

V.2.3. Le polymorphisme antigénique

La variation antigénique implique une expression coordonnée des antigènes de surface pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, établir une infection et une transmission vers un nouvel hôte. Les événements de recombinaison allélique ou ectopique durant la phase sexuée et asexuée sont à la base de cette variabilité antigénique. En effet, *P. falciparum* exprime différents antigènes au cours de son cycle de développement. Certains de ces antigènes sont en train d'être mis au point comme candidats vaccins : il s'agit des antigènes CSP (Circum Sporozoïte Proteine) (Stoute *et al.*, 1997), MSP1 (Merozoïte Surface Protein 1) (Tanabe *et al.*, 1987), MSP2 (Anders *et al.*, 2010), MSP3 (Jordan *et al.*, 2009), MSP4/MSP5 (Kedzierski *et al.*, 2000), AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) (Dutta *et al.*, 2002 ; kocken *et al.*, 2002 ; Mitchell *et al.*, 2004), EBA-175 (Erythrocyte-binding antigen), SERA5 (Serine repeat antigen 5) (Horri *et al.*, 2010 ; Palacpac *et al.*, 2011), RESA (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen) (Berzins *et al.*, 1986), RAP1/RAP2 (Rhoptry-Associated Protein 1 et 2) (Schofield *et al.*, 1986 ; Hamyuttanakom *et al.*, 1992), PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) (Smith *et al.*, 2000).

V.2.4. Le polymorphisme de nucléotide

C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases au sein du génome parasitaire. Le type le plus commun est le polymorphisme nucléotide simple (SNP). Ces variations de séquences sont stables, très abondantes et distribuées uniformément dans tout le génome du parasite. Ainsi, environ 112 000 SNP ont été identifiés chez *P. falciparum* (Volkman *et al.*, 2007). Ces SNP existent dans les gènes, y compris dans les exons, les introns et les régions régulatrices. Les SNP présents dans les régions codant peuvent être classés en 3 groupes: synonymes si les allèles différents codent le même acide aminé ; non synonymes si les deux allèles codent des acides aminés distincts et non-sens si un allèle code un codon stop et l'autre un acide aminé. Il y a plus de polymorphisme synonyme que de polymorphisme non synonyme à cause de la dégénérescence du code génétique. Les SNP sont de bons marqueurs génétiques utilisés dans l'étude de la diversité génétique des populations parasitaires (Volkman *et al.*, 2012).

De même, le changement d'un nucléotide peut se faire au niveau des séquences répétitives du génome parasitaire aboutissant à un polymorphisme microsatellite. Les microsatellites sont très nombreux dans le génome de *Plasmodium* et sont également utilisés comme des marqueurs génétiques pour de nombreuses études portant sur la diversité des populations parasitaire (Su *et al.*, 1996 ; Anderson *et al.*, 2000, Bogreau *et al.*, 2006).

VI. L'immunité antipalustre

On distingue deux types d'immunité : l'immunité innée et acquise.

VI.1. L'immunité innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme. Parmi les cellules en première ligne de réponse immunitaire innée après une infection par *P. falciparum*, on distingue : les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (NK).

Les macrophages ont la capacité de phagocyter les érythrocytes infectés par *P. falciparum* (impliquant le récepteur CD36) malgré l'absence d'opsonisation ou d'anticorps spécifique du paludisme (Stevenson *et al.*, 2004).

Les cellules NK seraient capables de reconnaître directement les hématies infectées grâce à des récepteurs non encore identifiés (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003 ; Korbel *et al.*, 2005). Cette interaction directe conduit à l'activation des cellules NK et à leur production d'interleukine 8 (IL-8). En revanche, la production d'interféron γ (IFN- γ) par les NK est dépendante d'une coopération avec les macrophages, notamment via la production d'IL-18 par ces derniers (Baratin *et al.*, 2005). Cette production d'IL-18 serait un élément important de la réponse immunitaire contre le parasite (Nagamine *et al.*, 2003 ; Kojima *et al.*, 2004). De même, une réponse IFN- γ robuste est associée chez l'homme à une susceptibilité plus faible à l'infection (Luty *et al.*, 1999). Les cellules dendritiques sont également activées via leur récepteur TLR 9 et produisent de l'interféron α (IFN- α) en présence d'hématies infectées par *P. falciparum* (Pichyangkul *et al.*, 2004).

L'immunité innée s'observe également dans certaines hémoglobinopathies telles que la drépanocytose, la thalassémie et le déficit en Glucose-6-phosphate déshydrogénase. Dans le cas des sujets drépanocytaires présentant une hémoglobine AS, la forme anormale des globules rouges falciformes et l'hypoxie qui en résulte (Pasvol *et al.*, 1978) semblent gêner fortement le développement du parasite. Cependant, l'immunité innée est variable suivant les facteurs génétiques intrinsèques de l'hôte (facteurs hématologiques, système HLA et appartenance ethnique). Par ailleurs, une exposition naturelle au parasite du paludisme conduit, avec le temps, à une immunité, à court terme, contre la maladie. Toutefois, une infection répétée est nécessaire pour maintenir cette immunité naturelle.

VI.1.2. L'immunité acquise

L'immunité acquise fait intervenir la production d'anticorps ou de cellules mémoires spécifiques au parasite. Cette immunité varie en fonction de l'âge des hôtes et des modalités de leur exposition au parasite. En cas d'infection plasmodiale, la synthèse d'anticorps va permettre de diminuer l'infection des cellules hépatiques par les sporozoïtes, et de limiter leur développement dans ces mêmes cellules via les lymphocytes T CD8+ et l'IFN- γ . Les anticorps vont aussi bloquer l'invasion des érythrocytes infectés. Les lymphocytes T CD4+ et IFN- γ vont stimuler la phagocytose des mérozoïtes et des parasites intra-érythrocytaires (Stevenson *et al.*, 2004).

En outre, dans les régions de transmission intense, on observe un état d'immunité protectrice (impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG) non stérilisant visualisé par une parasitémie faible et l'absence de signes cliniques. Cette immunité dite « prémunition » est lente à s'acquérir et dépend d'une pression constante du parasite. Cependant, cette prémunition disparaît en l'absence de contacts fréquents entre l'être humain et le parasite (elle disparaît après 12 à 24 mois si le sujet quitte la zone d'endémie).

En zone d'endémie élevée où les mères sont généralement immunes, les anticorps maternels transmis passivement aux fœtus protégeraient les nouveau-nés pendant quelques semaines à quelques mois contre les infections plasmodiales et les accès palustres. Des expériences de transfert passif d'immunoglobulines purifiées d'adultes hyper-immuns à des enfants, ont montré que les réponses anticorps participaient à l'immunité acquise naturellement contre les stades sanguins de *P. falciparum* (Cohen *et al.*, 1961).

VII. L'approche vaccinale

La mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme est une priorité mondiale en matière de santé et constituerait une étape décisive vers le contrôle et l'élimination éventuelle de cette maladie. Les vaccins agissent en préparant le système immunitaire humain à reconnaître, dépister et ensuite affaiblir ou détruire les pathogènes. Ainsi, un vaccin efficace contre le paludisme constitue un outil puissant dans la lutte contre cette maladie. Malgré les progrès fournis, seul le vaccin RTS,S/AS01 a montré des résultats acceptables avec un taux de protection entre 25 et 50% (Rosenthal PJ, 2015). Ceci s'explique par le fait que le cycle du parasite passe par plusieurs étapes entraînant la libération d'antigènes spécifiques à chaque phase et induisant des réponses immunitaires différentes. Cependant, il existe actuellement plusieurs programmes de recherche de vaccins ciblant des antigènes du cycle parasitaire.

VII.1. Les différents types de vaccins

Il existe trois types de vaccins ciblant les stades du cycle de *Plasmodium* : vaccin contre le stade pré-érythrocytaire, le stade érythrocytaire, et le stade sexué (Rogier *et al.*, 2006 ; Genton *et al.*, 2007 ; Richards *et al.*, 2009 ; Crompton *et al.*, 2010).

VII.1.1. Vaccins contre le stade pré-érythrocytaire

Ces vaccins ciblent les antigènes du stade exo-érythrocytaire et empêchent les sporozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les cellules du foie. La protéine la plus caractérisée est la CSP (Circum Sporozoite Protein) qui est exprimée avant et pendant l'infection des cellules hépatiques (Malik *et al.*, 1991). Ainsi, ils doivent induire des réponses immunes visant les sporozoïtes ou les schizontes hépatiques. Le vaccin RTS,S/AS01 est le plus avancé des candidats vaccins. Il est composé de particules protéiques comprenant 19 copies de la portion répétée centrale de la protéine CSP et d'une partie (épitope T) de sa région fusionnée à l'antigène S du virus de l'hépatite B, et d'un adjuvant complexe qui est l'AS01 de *P. falciparum* (Moreno *et al.*, 2015 ; Hoffman *et al.*, 2015).

D'autres antigènes candidats vaccins comme TRAP (Trombospin-Related, Adhesive Protein), STARP (Sporozoite Threonine and Asparagine Rich Protein), LSA-1 (Liver Stage Antigen-1) LSA-3, SALSA (Sporozoite Threonine and Asparagine Rich Protein) et EXP-1 (Exported Antigen-1), visent à induire une réponse cellulaire T contre les schizontes hépatiques (Hill *et al.*, 2006).

VII.1.2. Vaccins contre le stade érythrocytaire

Ces vaccins visent soit à empêcher l'invasion des hématies, et donc à contrôler les densités plasmodiales circulantes, soit à empêcher l'évolution des infections vers les formes cliniques et potentiellement graves de la maladie. A ce stade, le parasite exprime des antigènes exposés au système immunitaire. Les principaux antigènes candidats vaccins ayant atteint le stade des essais cliniques sont : MSP1 (Mérozoite Surface Protein 1) (Ogutu *et al.*, 2009), MSP3 (Cummings *et al.*, 2010 ; Sirima *et al.*, 2011), AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) (Remarque *et al.*, 2008 ; Sagara *et al.*, 2009), EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen) (El Sahly *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2010) et GLURP (Glutamate Rich Protein) (Hermsen *et al.*, 2007 ; Esen *et al.*, 2009). Les candidats vaccins en cours d'étude préclinique sont : MSP2, MSP4, MSP5, RAP2 (Rhoptry Associated Protein), RESA (Ring Infected Erythrocyte Surface Antigen), SERA5 (Serine-Repeat Antigen 5), PfEMP1 (Rogier *et al.*, 2006).

VII.1.3. Vaccins bloquant la transmission

Le principe de ce type de vaccin est d'immuniser l'homme contre un antigène du parasite ou du moustique. En effet, le moustique ingère des anticorps induits chez l'homme, au moment d'un repas sanguin. L'interaction antigène-anticorps a lieu chez le moustique réalisant ainsi un blocage de la sporogonie avec arrêt de la production de sporozoïtes et de la transmission. Ces vaccins n'empêcheraient pas la maladie ou l'infection pour ceux qui sont vaccinés mais éviteraient la propagation du paludisme par les moustiques des personnes infectées à celles qui ne le sont pas. De tels vaccins pourraient être utiles dans des régions de paludisme instable, où la transmission est naturellement faible, en complément d'interventions antivectorielles, ou en combinaison pour limiter la transmission de parasites échappant à la réponse immune induite par un autre vaccin antipaludique (Lavazec *et al.*, 2008). Les antigènes susceptibles de susciter la production d'anticorps bloquant la transmission comprennent Pfs230 (Eski *et al.*, 2006), Pfs48/45 (Healer *et al.*, 1997), Pfs27/25, Pfs28, Pfs25 (Bar *et al.*, 1991). Ces vaccins sont actuellement en cours d'essai de phase I ou II chez l'homme.

VII.2. Les antigènes candidats vaccins

La plupart des candidats vaccins ont été sélectionnés en fonction du type de réponses immunitaires qu'ils déclenchent chez l'animal. Actuellement, plusieurs candidats vaccins préventifs contre les infections à *P. falciparum* et *P. vivax* sont en développement (figure 9).

En 2015, 18 candidats vaccins, avec des modes d'action différentes, étaient au stade d'essai clinique (Moreno *et al.*, 2015 ; Hoffman *et al.*, 2015). Deux d'entre eux ciblent *P. vivax* : il s'agit de *P. vivax* CSP (VMP001) (Bennett *et al.*, 2016) et *P. vivax* DBP (de Barra *et al.*, 2014). Les autres antigènes candidats vaccins visent *P. falciparum* seule. Parmi ces antigènes nous pouvons citer : *P. falciparum* CSP (RTS,S) (Stoute *et al.*, 1997 ; The Rts SCTP, 2014), *P. falciparum* CSP (RTS,S) + *P. falciparum* AMA-1 (Chuang *et al.*, 2013 ; Tamminga *et al.*, 2013), *P. falciparum* ME-TRAP (Dudareva *et al.*, 2009 ; Hodgson *et al.*, 2014), *P. falciparum* MSP-1/*P. falciparum* AMA-1 (Sheehy *et al.*, 2012 ; Hodgson *et al.*, 2014), *P. falciparum* AMA-1 (FMP2.1) (Polhemus *et al.*, 2007 ; Laurens *et al.*, 2013), *P. falciparum* hybrid GLURP+MSP-3 (GMZ2) (Jepsen *et al.*, 2013), *P. falciparum* Pfs25-EPA, *P. falciparum* Pfs230-EPA (Moreno *et al.*, 2015). Certains de ces antigènes sont impliqués dans l'invasion des globules rouges par le parasite et sont exprimés à la surface des mérozoïtes (MSP1, MSP3, GLURP) ou sur l'organelle apicale telle que AMA1. Cependant, parmi les antigènes protéiques recombinant ciblant différentes phases du cycle de vie parasitaire en cours d'élaboration, seul le RTS, S/AS01 a achevé l'évaluation de phase 3.

Le rapport bénéfices-risques est positif et l'agence européenne des médicaments (AEM) a donné un avis favorable pour l'utilisation du RTS, S/AS01 (Méchain *et al.*, 2015).

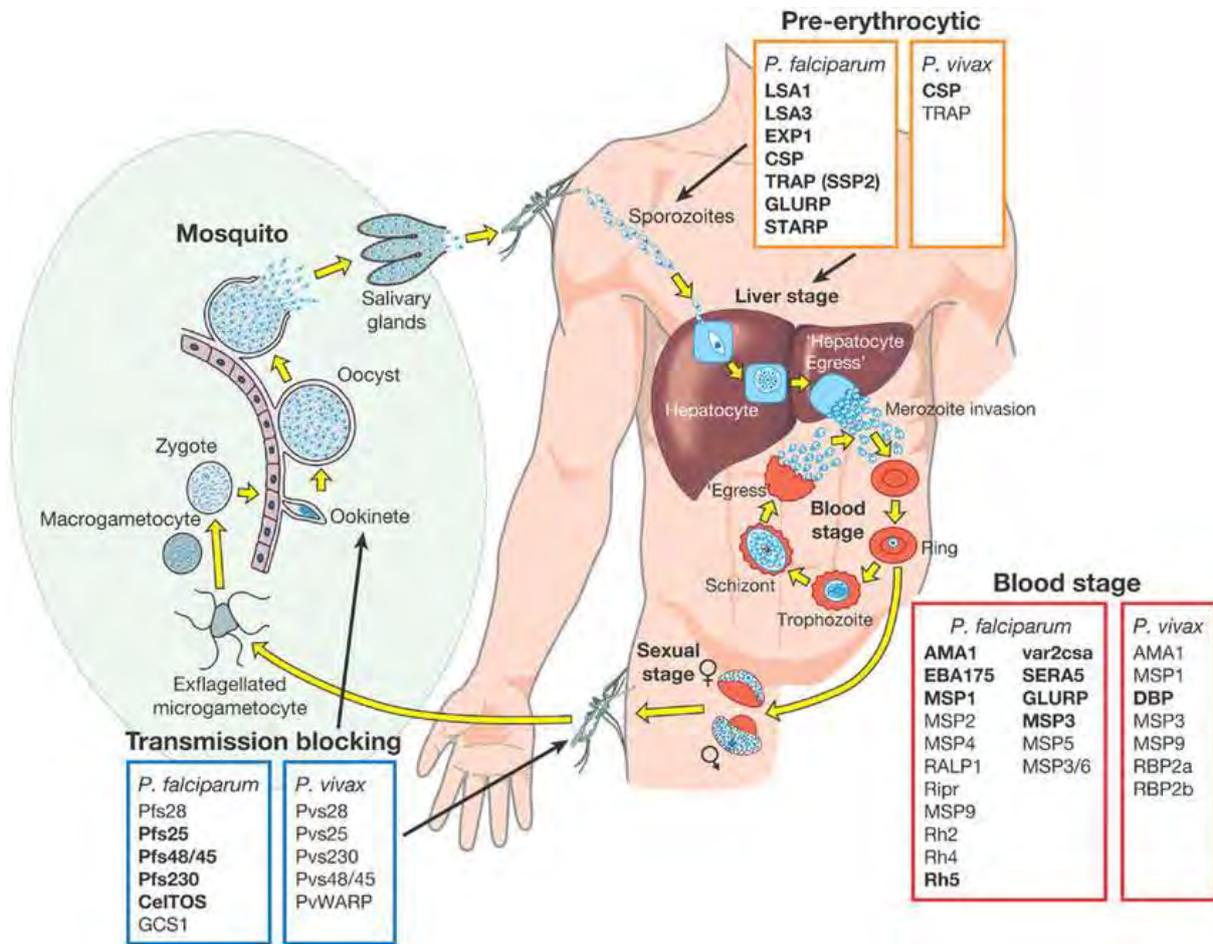


Figure 9 : Cycle de vie des *Plasmodium* humains et antigènes candidats vaccins (Barry *et al.*, 2014).

DEUXIEME PARTIE:
TRAVAUX DE THESE

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DES ETUDES REALISEES

CADRE DE L'ETUDE

La majeure partie des échantillons qui ont fait l'objet de nos différentes études ont été collectés à la Section de Lutte Anti-Parasitaire (SLAP) situé au cœur de la Commune et Région de Thiès (au Sénégal). La région de Thiès est située à l'Ouest du Sénégal, à 70 km de la capitale Dakar. Ses coordonnées géographiques sont 14° 46' 58'' de latitude Nord et 16° 54' 06'' de longitude Ouest (figure 10). Elle a une superficie de 6 601 km² et sa population est estimée à 1 709 112 habitants, avec une densité de 256 hab. /km² en 2013 (ANSD, 2013).

Cette région est caractérisée par un relief relativement plat avec une moyenne pluviométrique de 300 à 500 mm. La transmission du paludisme y est étroitement liée au rythme des pluies et s'effectue, en général, au cours de la saison des pluies et au début de la saison sèche. Elle est assurée par *Anopheles gambiae* et *Anopheles Arabiensis* (PNLP, 2015).



Figure 10 : Carte de localisation de la Région de Thiès au Sénégal

L'autre partie des échantillons proviennent, dans le cadre d'activités collaboratives, de différentes zones géographiques (hors du Sénégal) marquées par des niveaux d'endémicités différentes ; nous les avons intégrés dans le cadre de nos études comparatives afin de mieux caractériser le polymorphisme des gènes *Pfdhfr*, *Pfdhps* et *PfRh2b*. En effet, la transmission du paludisme est holo-endémique en Mlandizi (en Tanzanie), Méso à hyperendémique en Grande Comore (aux Îles Comores) et saisonnière en Brikama (en Gambie).

**ETUDE N°1 : Etude du
polymorphisme des gènes *Pfdhfr* et
Pfdhps associé à la résistance de
Plasmodium falciparum à la
Sulfadoxine-Pyriméthamine dans
deux zones d'endémicités différentes**

RESEARCH

Open Access



High resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr* and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations

Cyrille K. Diédhiou^{2†}, Yaye Dié Ndiaye^{1,5†*}, Amy K. Bei^{1,2,3,5,6}, Baba Dieye^{1,5}, Aminata Mbaye¹, Nasseridine Papa Mze², Rachel F. Daniels^{6,8}, Ibrahima M. Ndiaye¹, Awa B. Déme^{1,3}, Amy Gaye¹, Mouhamad Sy¹, Tolla Ndiaye¹, Aida S. Badiane^{1,5}, Mouhamadou Ndiaye^{1,5}, Zul Premji^{3,7}, Dyann F. Wirth^{6,8}, Souleymane Mboup², Donald Krogstad^{4,5}, Sarah K. Volkman^{5,6,8,9}, Ambroise D. Ahouidi^{2,5†} and Daouda Ndiaye^{1,5†}

Introduction

Plasmodium falciparum, l'espèce la plus mortelle, est maintenant résistante à tous les antipaludiques utilisés (Ariey *et al.*, 2014 ; WHO *et al.*, 2015). Par conséquent, la surveillance continue de l'efficacité des médicaments antipaludiques est essentielle dans l'orientation de la politique de traitement.

Au Sénégal, la transmission du paludisme est saisonnière, avec une baisse des prévalences parasitaires. Cependant, l'incidence du paludisme était élevée, en particulier dans certaines parties du pays où les décès dus au paludisme persistent (PNLP, 2014).

En revanche, la transmission du paludisme en Tanzanie est permanente (Mubi *et al.*, 2013), avec une forte charge d'infections palustres, comme en témoignent les 678 207 cas et 5688 décès due au paludisme en 2014 (WHO, 2015).

La lutte contre ce fléau repose prioritairement sur le diagnostic précoce et le traitement des cas cliniques, afin de réduire la transmission de l'infection et d'éviter la propagation d'une résistance aux antipaludiques. En effet, la hausse du taux de résistance du *P. falciparum* à la chloroquine (CQ) a conduit la Tanzanie à changer la CQ par la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en 2001 et ensuite aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) en 2006. Le Sénégal a changé la CQ par la SP-amodiaquine en 2003, puis aux ACT en 2006. Cependant, la SP est utilisée pour la prévention du paludisme chez la femme enceinte dans le cadre du Traitement Préventif Intermittent (TPI) (WHO, 2004 ; 2012) ou en association avec l'amodiaquine pour la Chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) (WHO, 2012). Néanmoins, l'utilisation massive de la SP va probablement contribuer à l'émergence de souches résistantes. En effet, des études antérieures ont révélé des mutations génétiques chez les parasites leur conférant une résistance à la SP. Ainsi, les mutations au niveau des codons N51I, C59R, S108N et I164L du gène *Pfdhfr* ont été associées à la résistance à la pyriméthamine (Bzik *et al.*, 1987 ; Cowman *et al.*, 1988 ; Peterson *et al.*, 1988 ; 1990 ; Foote *et al.*, 1990 ; Basco *et al.*, 1995 ; Reeder *et al.*, 1996) tandis que les mutations S436A, S436P, A437G, K540E, A581G et A613T/S du gène *Pfdhps* ont été liées à la résistance à la sulfadoxine (Brooks *et al.*, 1994 ; Triglia *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1997 ; Bickii *et al.*, 1998 ; Warhurst *et al.*, 2001 ; Warsame *et al.*, 2001). Par conséquent, la surveillance systématique des mutations génétiques affectant l'efficacité de la SP est essentielle pour voir si cette combinaison pourrait continuer à être utilisée pour le traitement du paludisme non compliqué ou pour le TPI chez les femmes enceintes et les enfants.

Différentes méthodes ont été développées pour évaluer l'association des polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) et des phénotypes spécifiques.

La réaction de polymérisation en chaine suivie du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP), la PCR en temps réel Taqman avec des sondes spécifiques d'allèles et l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) sont les techniques les plus utilisées pour ces types d'études (Duraisingh *et al.*, 2003 ; O'Meara *et al.*, 2001). Cependant, la PCR-RFLP prend du temps et nécessite des enzymes de restriction spécifiques pour chaque SNP. La DGGE nécessite une grande expertise qui n'est pas toujours disponible dans les zones endémiques. Les sondes fluorescentes Taqman sont couteuses et les réactifs expirent rapidement. Par contre, l'analyse de fusion à haute résolution (HRM) est une méthode d'analyse post-PCR qui permet de détecter les mutations dans les séquences d'acides nucléiques et d'identifier de nouvelles variantes génétiques pouvant être confirmées par séquençage (Gan *et al.*, 2010 ; Daniels *et al.*, 2012). En outre, cette technique a la capacité de détecter des allèles mineurs dans des infections mixtes (Andriantsoanirina *et al.*, 2009 ; Gan *et al.*, 2010 ; Reed *et al.*, 2007).

Les objectifs de cette étude étaient : (1) de comparer les résultats de la HRM avec ceux de la PCR-RFLP ; et (2) de déterminer la prévalence des mutations au niveau des codons N51I, C59R et S108N du gène *Pfdhfr* et A437G, K540E, A581G et A613T/S du gène *Pfdhps*, dans deux pays endémiques ayant des fréquences d'infections polyclonales différentes.

I. Matériel et méthodes

I.1. Population d'étude

Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons collectés dans deux pays ayant des niveaux d'endémicités palustres différents.

Au Sénégal, les échantillons ont été collectés à Thiès, au Service de Lutte Antiparasitaire (SLAP). Le paludisme y est hypo-endémique avec un taux d'inoculation entomologique de 0 à 20 piqûres infectantes par personne et par an ($0 < \text{EIR} < 20$) (PNLP, 2015).

En Tanzanie les échantillons ont été collectés au Centre de santé de Mlandizi, dans la région côtière de Kibaha, à 40 km au nord-ouest de Dar es-Salaam. Le paludisme y est holo-endémique avec un taux d'inoculation entomologique moyen de 200 piqûres infectantes par personne et par an (Premji *et al.*, 1997).

Les personnes venues en consultation pour une fièvre et suspicion de paludisme au SLAP de Thiès en 2011 et au centre de santé de Mlandizi en 2003-2004 ont été testées par microscopie pour confirmer l'infection palustre. Les patients âgés de deux à vingt ans, qui ont présenté une lame positive à *P. falciparum* ont été invités à participer à cette étude.

Ces études ont été approuvées par la Commission tanzanienne pour la science et la technologie (permis n° 2003-207-CC-2003-102) et le comité d'éthique du Ministère de la Santé du Sénégal (0127MSAS / DPRS / CNRES). Une évaluation éthique et une approbation ont ensuite été fournies par le Comité des sujets humains de l'École de santé publique Harvard T.H. Chan (P11778-101) et le Comité des sujets humains de l'Université de Tulane, Nouveau Orléans.

I.2. Collecte des échantillons

Après consentement éclairé, des prélèvements de sang ont été effectués et quelques gouttes recueillies sur des papiers filtres Whatman FTA. Au total, Cent (100) échantillons ont été collectés, soit Cinquante (50) échantillons par site.

I.3. Extraction de l'ADN parasite

L'ADN parasite a été extrait à partir du papier-filtre en utilisant la méthode du kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) selon les conditions du fabricant. L'ADN parasite a été conservé à -20°C pour les études génétiques.

I.4. Génotypage du gène *Pfdhfr* par PCR-RFLP

L'analyse des échantillons était basée sur la méthode standard, la PCR-RFLP, telle que décrite précédemment par Jelinek et *al.* (Jelinek *et al.*, 1998).

Après extraction, l'ADN génomique de *P. falciparum* a été amplifié en utilisant le protocole décrit dans le tableau I. Des contrôles positifs (3D7 et Dd2) et négatifs (eau bidistillée stérile) ont été inclus dans toutes les réactions d'amplification.

Le produit de PCR est mis en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) dans le tampon TBE 1% en utilisant un marqueur de poids moléculaire (Quick Load[®], 100 pb DNA Ladder).

Une solution de bromure d'éthidium (3µl) est ajoutée afin de visualiser les bandes d'ADN par illumination ultraviolette.

Après amplification par PCR, nous avons utilisé 0,5 µl d'enzymes de restrictions spécifiques pour digérer les amplicons de PCR pendant, au moins, 6 heures comme indiqué dans les tableaux II, III et IV.

Le produit de digestion est mis en évidence par électrophorèse en gel d'agarose (2%) dans le tampon TBE 1% en utilisant un marqueur de poids moléculaire (Quick Load[®], 100pb DNA Ladder).

Tableau I : Programme et volume réactionnel de la première et deuxième amplification du gène *Pfdhfr*

Première amplification				
Gène		Séquences des amorces	Programme	
<i>Pfdhfr</i>		M1 : 5'-TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC-3'	1. 94°C 3 min 2. 94°C 1 min	
		M5 : 5'-AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA-3'	3. 50°C 2 min 4. 72°C 2 min	
			5. Retourner à 2 et répéter 35 fois	
			6. 72°C 3 min	
			7. 4°C pendant 48h	
	Volume réactionnel : Gotaq : 6 µl ; M1 : 1µl ; M5 : 1µl ; H₂O : 11µl ;			
	ADN (extrait à partir du papier filtre) : 1µl			
Volume total: 20µl				
Deuxième amplification				
Gène	Codons	Séquences des amorces	Programme	
<i>Pfdhfr</i>	N51I	M3 : 5'-TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT-3'	1. 94°C 2 min 2. 94°C 1 min	
		F/ : 5'-AAA TTC TTG A TA AAC AAC GGA ACC TTT TA-3'	3. 45°C 1 min 4. 72°C 2 min	
	C59R	M4: 5'-TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT-3'	5. Retourner à 2 et répéter 35 fois 6. 72°C 3 min	
		F: 5'-AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA-3'	7. 4°C pendant 48h	
	S108N	M4: 5'-TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT-3'		
		F: 5'-AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA-3'		
	Volume réactionnel : Gotaq : 6 µl ; M1 : 1µl ; M5 : 1µl ; H₂O : 11µl ;			
ADN (Produit de la 1^{ère} Amplification) : 1µl				
Volume total: 20µl				

Tableau II : Conditions de digestion du codon 51 à la suite de la PCR nichée

Constituants		Volume (µl) pour une réaction
Eau	Eau bidistillée stérile	5
Tampon	NEB 1	0,5
Enzyme	Tsp 509I	0,5
ADN	Produit PCR 2 ^{ème} amplification	4
Incuber à 65°C pendant toute la nuit ou au moins pendant 6 heures		

Tableau III : Conditions de digestion du codon 59 à la suite de la PCR nichée

Constituants		Volume (µl) pour une réaction
Eau	Eau bidistillée stérile	5
Tampon	NEB 2	0,5
Enzyme	XmnI	0,5
ADN	Produit PCR 2 ^{ème} amplification	4
Incuber à 37°C pendant toute la nuit ou au moins pendant 6 heures		

Tableau IV : Conditions de digestion du codon 108 à la suite de la PCR nichée

Constituants		Volume (µl) pour une réaction
Eau	Eau bidistillée stérile	5
Tampon	NEB 2	0,5
Enzyme	AluI	0,5
ADN	Produit PCR 2 ^{ème} amplification	4
Incuber à 37°C pendant toute la nuit ou au moins pendant 6 heures		

- **Interprétation des résultats de la digestion**

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celles attendues. La digestion par l'enzyme Tsp 509I donnera, d'une part, des fragments de 153 et 120 pb pour le type sauvage N51 et, d'autre part, des fragments de 217 et 120 pb pour le type mutant I51. La digestion par l'enzyme XmnI donnera des fragments de 189 et 137 pb (type sauvage C59) et 162 et 137 pb (type mutant R59).

La digestion par l'enzyme AluI donnera des fragments de 180 et 118 pb pour le type sauvage S108 et des fragments de 299 et 27 pb pour le type mutant N108. Les bandes apparaissant, à la fois, au niveau des deux témoins, correspondent aux souches mixtes.

I.5. Génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* par "High Resolution Melting"

La réaction a été réalisée à l'aide de la machine LightScanner-32 en utilisant des amorces et des sondes comme décrit précédemment par Daniels et *al.* (Daniels *et al.*, 2012). Des capillaires en verre qui sont utilisés, sont idéals pour mesurer les fréquences alléliques mineures (0,01%) dans des échantillons de génotypes mixtes.

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées en effectuant un mélange réactionnel contenant du LightScanner 2,5 (Biofire), des amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 0,05 μM , et 0,2 μM respectivement et 1 μl d'ADN génomique, comme décrit précédemment Daniels et *al.* (Daniels *et al.*, 2012).

- **Méthodologie**

Après extraction, l'ADN génomique de *P. falciparum* est mis en présence de couple d'amorces spécifiques (amorce F et R) et d'une sonde (Tableau V).

Table IX: Prévalence des allèles du gène *Pfdhfr* au niveau des codons N51I, C59R, et S108N à partir d'isolats collectés au Sénégal et en Tanzanie en utilisant la PCR-RFLP et la HRM.

Gène	Allèles	SENEGAL (N= 50)			TANZANIE(N= 50)		
		PCR-RFLP	HRM	p-value	PCR-RFLP	HRM	p-value
<i>Pfdhfr</i> 51	N51	1/50 (2%)	0	1	09/50(18%)	08/50 (16%)	1
	51I	49/50 (98%)	47/50 (94%)	0,6173	37/50 (74%)	26/50 (52%)	0,0365
	N51+51I	0	3/50 (6%)	0,2424	04/50 (08%)	16/50 (32%)	0,005
<i>Pfdhfr</i> 59	C59	2/50 (4%)	1/50 (2%)	1	19/50 (38%)	12/50 (24%)	0,1941
	59R	48/50 (96%)	46/50 (92%)	0,6777	24/50 (48%)	22/50 (44%)	0,8411
	C59+59R	0	3/50 (6%)	0,2424	07/50 (14%)	16/50 (32%)	0,0558
<i>Pfdhfr</i> 108	S108	2/50 (4%)	0	0,4949	07/50 (14%)	07/50 (14%)	1
	108N	48/50 (96%)	49/50 (98%)	1	35/50 (70%)	38/50 (76%)	0,6528
	S108+108N	0	1/50 (2%)	1	08/50 (16%)	05/50 (10%)	0,5535

N : nombre total de patient

La première étape consiste à préparer un mélange d'amorces et de sonde selon le tableau VI :

Tableau VI : Volume réactionnel du mélange d'amorces et de sonde

Constituants	Volume (µl) pour une réaction
H ₂ O (reagent grade water)	42
Amorce sens N51I/C59R ou S108N – F	1
Amorce anti-sens N51I/C59R ou S108N – R	5
Sonde	2

La deuxième étape consiste à préparer le mélange réactionnel selon le tableau VII :

Tableau VII : volume du mélange réactionnel

Constituants	Volume (µl) pour une réaction
H ₂ O (reagent grade water)	4
2,5X Light Scanner Mix	4
Mix d'amorces et de la sonde	1

On répartit ensuite 9 µl du milieu réactionnel dans les capillaires en verre puis 1 µl d'ADN de chaque échantillon sera ajouté. Le volume final dans chaque capillaire est de 10µl. Les capillaires sont centrifugés brièvement dans la mini-centrifugeuse puis déposés soigneusement dans les trous du carrousel. Ensuite le carrousel est placé dans l'appareil de sorte que la flèche «déverrouillée» corresponde à la flèche sur la base, puis tourné dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à ce que la flèche dans la position «verrouillée» corresponde à la flèche sur la base. L'appareil (LightScanner 32) est programmé comme suit (Tableau VIII) :

Tableau VIII : Programme de la réaction HRM

Nom du Programme	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	95°C 01 min	1
cycle	95°C 05 s	
	56°C 30 s	55
Pré-fusion	95°C 05 s	
	37°C 05 s	1
fusion	45°C à 90°C 06 s	1
	(avec 0,3°C/s)	

- **Interprétation des résultats de la HRM**

Le logiciel standard fourni avec l'instrument a été utilisé pour l'analyse des sondes non marquées afin de visualiser les pics de fusion basés sur les différentes températures de fusion et sur l'identification des différentes paires de bases. Ces pics sont comparés à ceux des témoins pour identifier le profil de l'allèle correspondant pour un test donné.

Dans notre étude nous avons utilisé les contrôles suivants : 3D7, Tm90, 7G8, Dd2, HB3 et VS1. Chaque contrôle a son pic et sa couleur caractéristique qui résulte de sa température de fusion. Ainsi, pour chaque codon, tous les échantillons qui auront le même profil que les contrôles sauvages sont dits sauvages. Ceux qui auront le même profil que les contrôles mutants sont dits Mutants et ceux qui présenteront deux pics sont dits Mixtes (Mix : mutant/sauvage).

Au niveau du codon N51I, les échantillons qui auront le même profil que 3D7 ou Tm90 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que Dd2 ou 7G8 sont de types mutants.

Au niveau du codon C59R, les échantillons qui auront le même profil que 3D7 ou 7G8 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que Dd2 ou Tm90 sont de types mutants.

Pour le codon S108N, les échantillons qui auront le même profil que 3D7 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que Dd2 sont de types mutants.

Pour le codon A437G, les échantillons qui auront le même profil que HB3 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que 3D7 ou Dd2 sont de types mutants.

Pour le codon K540E, les échantillons qui auront le même profil que Dd2 sont de types sauvages.

Pour le codon A581G, les échantillons qui auront le même profil que 3D7 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que Tm90 sont de types mutants.

Pour le codon A613S/T, les échantillons qui auront le même profil que 3D7 sont de types sauvages, ceux qui auront le même profil que Dd2 ou VS1 sont de types mutants.

Par ailleurs, si un échantillon présente un pic qui ne correspond pas à ces contrôles on en déduit l'existence possible d'une nouvelle variante qui sera confirmée par séquençage.

I.6. Génotypage des gènes *msp 1* et *msp 2* par PCR nichée

Le bloc 2 de *msp 1* (Miller *et al.*, 1993) et le bloc 3 de *msp 2* (Smythe *et al.*, 1990) ont été amplifiés par une PCR nichée. Les séquences des amorces et le protocole de PCR sont décrits en détail par Snounou *et al.* (Snounou *et al.*, 1999).

La PCR a été effectuée sur un volume total de 20 µl qui contenait 6 µl de Gotaq (ADN Taq polymérase, dNTPs, MgCl₂ et un tampon de réaction (pH 8,5)), 1 µl de chaque amorce (amorces sens et anti-sens à une concentration de 0,05 µM) et 11 µl d'eau bidistillée stérile.

Pour la première réaction d'amplification, 1 µl d'ADN génomique a été ajouté et pour la seconde, nous avons ajouté 1 µl du produit de PCR de la première amplification. Des souches de référence 3D7 (pour les allèles *msp1-K1* et *msp2-IC*) ; Dd2 (pour *msp1-MAD20* et *msp2-FC*) et 7G8 (pour *msp1-RO33*) ont été utilisées comme contrôles positifs. L'eau bidistillée stérile a été utilisée comme contrôle négatif.

Le programme de la première PCR était : une dénaturation initiale à 95° C pendant 5 min, suivie de 35 cycles (de 94° C pendant 1 min, 58° C pendant 2 min, 72° C pendant 2 min), et un cycle d'extension finale de 72° C pendant 3 min. Le programme de la deuxième PCR était : une dénaturation initiale à 95° C pendant 5 min, suivie de 35 cycles (de 94°C pendant 1 min, 61°C pendant 2 min, 72° C pendant 2 min), et un cycle d'extension finale de 72° C pendant 3 min. Les produits d'amplification ont été analysés en se basant sur les différences de taille sur un gel d'agarose à 2%.

La multiplicité des infections (MOI) a été définie comme le rapport du nombre de patients portant plus d'allèles soit pour *msp 1* ou *msp 2* sur le nombre total de sujets infectés.

Le nombre de patients avec plus d'un fragment amplifié par PCR dans la population totale est défini comme la fréquence des infections polyclonales.

I.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Epi Info, version 7. Le test exact de Fischer a été utilisé pour déterminer la concordance des résultats entre la PCR-RFLP et la HRM. Le test Z pour deux proportions de population a été utilisé pour comparer la prévalence des allèles dans chaque pays. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la MOI dans les populations d'échantillons de chaque pays. Le test est significatif si la valeur p est inférieure à 0,05.

II. Résultats

II.1. Résultats de la PCR-RFLP

Au total 100 isolats (50 de Tanzanie et 50 de Thiès) ont été amplifiés et analysés avec succès (figure 11).

Au Sénégal, 98% (49/50) des échantillons avaient l'allèle mutant au niveau du codon N51I, 96% (48/50) au niveau des codons S108N et C59R. En outre, l'analyse des résultats a révélé 2% (1/50) d'allèles sauvages N51 et 4% (2/50) d'allèles sauvages C59 et S108. Cependant, aucune infection mixte n'a été trouvée par PCR-RFLP.

En Tanzanie, nous avons obtenu 74% (37/50), 48% (24/50) et 70% (35/50) de mutations respectivement au niveau des codons N51I, C59R et S108N. 18% (9/50) des échantillons étaient sauvages pour le codon N51I, 38% (19/50) pour le codon C59R et 14% (7/50) pour le codon S108N. La proportion des infections mixtes représentait 8% (4/50) des échantillons au niveau du codon N51I, 14% (7/50) au niveau du codon C59R et 16% (8/50) au niveau du codon S108N.

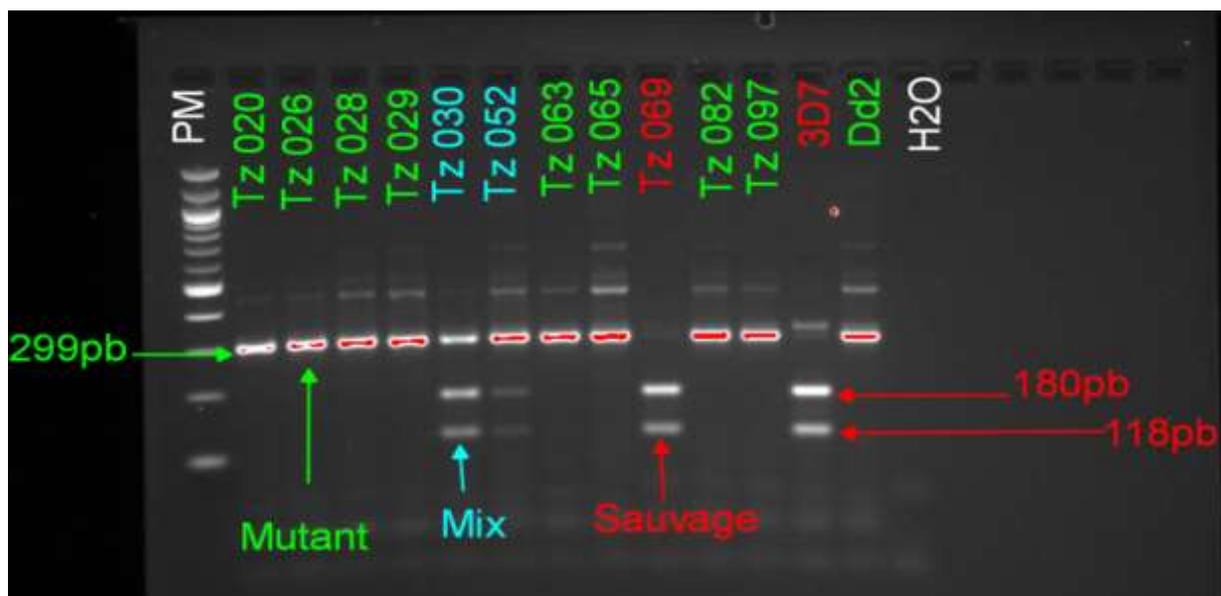


Figure 11 : Photographie de gel de produit de PCR après digestion du codon S108N du gène *Pfdhfr* de quelques échantillons.

PM = marqueur de poids moléculaire ; H₂O = contrôle négatif ;

3D7= contrôle positif de type sauvage ; 180 pb et 118 pb = tailles de la souche sauvage ;

Dd2= contrôle positif de type mutant ; 299 pb = taille de la souche mutante ;

Tz 030 (isolat de Tanzanie patient N° 030) est un isolat Mix (sauvage + mutant)

II.2. Résultats de la HRM

Le génotypage de *Pfdhfr* par HRM a donné des résultats interprétables sur tous les échantillons testés (figure 12).

Au Sénégal, 94% (47/50) des échantillons présentaient une mutation au niveau du codon N51I, 92% (46/50) au niveau du codon C59R et 98% (49/50) au niveau du codon S108N. Cependant, une prévalence de 2% (1/50) d'allèles sauvages a été trouvée seulement pour le codon C59R. Les allèles mixtes ont été trouvés à des proportions de 6% (3/50) au niveau des codons N51I/C59R et de 2% (1/50) au niveau du codon S108N.

En Tanzanie, 52% (26/50), 44% (22/50) et 76% (38/50) des échantillons présentaient respectivement l'allèle mutant au niveau des codons N51I, C59R et S108N. Des proportions de 16% (8/50), 24% (12/50) et 14% (7/50) d'allèles sauvages ont respectivement été retrouvées pour les codons N51I, C59R et S108N. En outre, 32% (16/50) des échantillons avaient des allèles mixtes au niveau des codons N51I/C59R et 10% (5/50) au niveau du codon S108N.

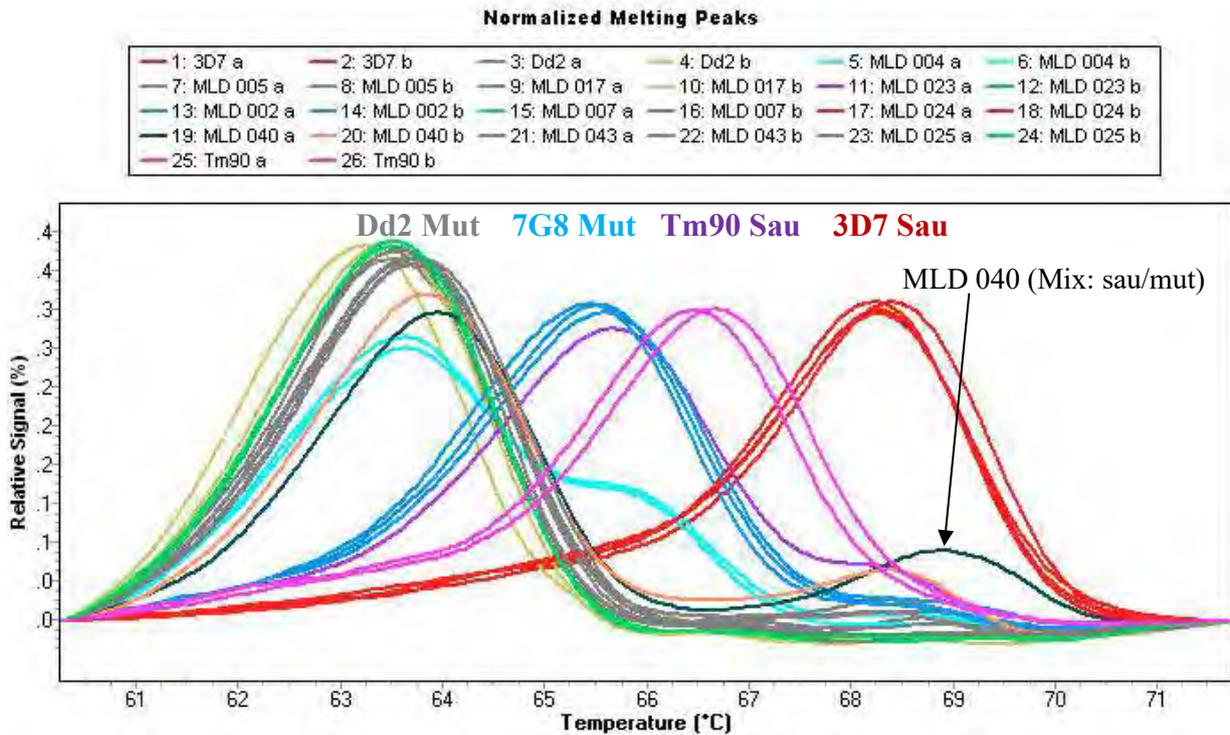


Figure 12 : Exemple de profils sauvage, mutant et mixte de quelques échantillons d'ADN au niveau du codon N51I du gène *Pfdhfr*

Le pic Dd2 et 7G8 représente le profil mutant au niveau du codon N51I ;

Le pic 3D7 et Tm90 représente le profil sauvage au niveau du codon N51I ;

MLD 040 (échantillon de Tanzanie) présente deux pics : c'est un échantillon mixte (sauvage + mutant).

II.3. Comparaison entre PCR - RFLP et HRM

Les données de génotypage des codons N51I, C59R et S108N au niveau du gène *Pfdhfr* ont été utilisées pour comparer la PCR-RFLP et la HRM. La technique qui avait détecté plus d'allèles mixtes, était considérée comme plus sensible.

Au Sénégal, une prévalence élevée d'allèles mutants a été observée au niveau des codons N51I, C59R et S108N pour les deux techniques avec peu de différences. Cependant, aucune infection mixte n'a été détectée par PCR-RFLP. Par contre, la HRM a pu détecter un taux d'infections mixtes.

En Tanzanie, une prévalence élevée d'allèles mutants a été observée au niveau des codons N51I, C59R et S108N pour les deux techniques avec une différence significative uniquement au niveau du codon N51I ($p= 0.0365$). Cependant, la HRM avait détecté plus d'allèles mixtes au niveau des échantillons. Ainsi, la fréquence des infections mixtes détectées par HRM était plus élevée que celle obtenue par PCR-RFLP au niveau des codons N51I ($p = 0,005$) et C59R (Tableau IX).

En résumé, nos résultats ont montré que la HRM était plus sensible que la PCR-RFLP pour la détection des infections mixtes. C'est ainsi que la HRM a été utilisée pour analyser les mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* dans les deux pays.

Tableau V : séquences des amorces et des sondes utilisées pour la HRM

Gène	SNP	Séquences des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens	Séquences des sondes
<i>Pfdhfr</i>	N51/C59	ACATTTAGAGGCTAGGAAAT AAAGGAGT	ATATTTACATCTCTTATATTTCAATTT TTCATATTTTGGATTCATTCAC	AAATGTAATTCCTAGATATG AAATATTTTGTGCAG-block
	S108	CTGTGGATAATGTAAATGATAT GCCTAATTCTA	GACAATATAACATTTATCCTATTGCTT AAAGGT	GGAAGAACAAGCTGGGAAAG CAT-block
	I164	ACAAAGTTGAAGATCTAATAG TTTTACTTTGGG	CTGGAAAAAATACATCACATTCATAT GTACTATTTATTCTA	AATGTTTTATTATAGGAGGTT CCG-block
	S436/A437	GAAATGTTTGAATGATAAATG AAGGTGCTA	CAGGAAACAGCTATGACGAAATAAT GTAATACAGGTACTACTAAATCTCT	ATCCTCTGGTCCTTTGTATTATA CC-block
	K540	GTGTTGATAATGATTTAGTTGA TATAATTAATGATATTAGTGC	GTTTATCCATTGTATGTGGATTTCCCTC TT	TAATCCAGAAATTATAAAAATT ATTAAAAAAAAC-block
	A581	CTTGTATTAAATGGAATACCCTC GTTATAGGA	AGTGGATACATCATATACATGTAT ATTTTGTAAAG	TTGGATTAGGATTTGCCGAAGA AACATGATCA-block
	A613	CTCTTACAAAAATACATGTAT ATGATGAGTATCCACTT	CATGTAATTTTGTGTATTATTATA CAACAATTTTGA	AAGATTTATTGCCCATTTGCAT GA-block

II.4. Prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* par HRM au Sénégal et en Tanzanie

L'analyse des mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* (codons N51I, C59R et S108N) et *Pfdhps* (codons A437G, K540E, A581G et A613T/S) a donné des résultats interprétables. Le tableau X résume la prévalence des mutations au niveau de chaque codon pour les infections monoclonales, polyclonales (défini par le génotypage *m*sp 1 et *m*sp 2) et au niveau de la population globale.

Pour le gène *Pfdhps*, aucune mutation n'a été retrouvée au niveau des codons K540E et A581G au niveau des deux pays. En outre, les résultats ont montré que les infections monoclonales étaient plus fréquentes au Sénégal. Cependant, la majorité des infections sont polyclonales en Tanzanie. Toutefois, la prévalence des allèles mutants était plus élevée au Sénégal qu'en Tanzanie au niveau des codons A437G ($p=0,02$), N51I ($p=0,00024$), C59R ($p=0,0001$) et S108N ($p=0,01$).

La prévalence des allèles mixtes était plus élevée en Tanzanie qu'au Sénégal. Pour les infections monoclonales, les allèles mixtes étaient plus fréquents au niveau des codons N51I et C59R ($p= 0,04$). Pour les infections polyclonales, les allèles mixtes étaient significativement plus élevés au niveau des codons A437G ($p= 0,02$), N51I ($p= 0,002$), C59R ($p = 0,008$) et S108N ($p = 0,04$) (Tableau X).

Par ailleurs, pour estimer le nombre d'allèles résistants chez un patient, nous avons combiné les résultats de génotypage des allèles des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* avec ceux des gènes *m*sp1 et *m*sp2. Cette analyse nous a permis d'estimer le nombre d'allèles sauvages ou mutants présents dans chaque gène.

En plus, les résultats de génotypage des gènes *m*sp1 et *m*sp2, ont montré qu'il y a eu plus d'infections polyclonales en Tanzanie (72%) qu'au Sénégal (54%), bien que la différence ne fût pas statistiquement significative ($p= 0,06$). De même, la Tanzanie avait une MOI significativement plus élevée (MOI = 2,06) qu'au Sénégal (MOI = 1,56) ($p= 0,011$) (Tableau XI).

De façon globale, l'analyse des résultats a montré que la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* était plus élevée au Sénégal qu'en Tanzanie (Tableau X et XI).

La simple mutation S108N ($p = 0,01$) et la double mutation (*Pfdhfr* C59R / S108N) ($p= 0,005$) étaient plus élevées au Sénégal. Par contre la triple mutation (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N) et la quadruple mutation (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N et *Pfdhps* A437G) étaient plus représentés en Tanzanie, mais la différence n'était pas significative (Tableau XII). La quintuple mutation n'a pas été trouvée dans les deux pays.

Tableau X: Prévalence des mutations au niveau des gènes *Pfálhr* et *Pfálps* au Sénégal et en Tanzanie: infections monoclonales, polyclonales et combinées

Gènes	Allèles	Infections monoclonales			Infections Polyclonales			Prévalences combinées des mutations		
		Sénégal	Tanzanie	p-value	Sénégal	Tanzanie	p-value	Sénégal	Tanzanie	p-value
<i>Pfálps</i>	A437	10/23 (43,47%)	6/14 (42,86%)	0,9681	8/27 (29,62%)	12/36 (33,33%)	0,75656	18/50 (36%)	18/50 (36%)	1
<i>Pfálps</i>	G437	12/23 (52,17%)	6/14 (42,86%)	0,58	16/27 (59,25%)	11/36 (30,56%)	0,0226	28/50 (56%)	17/50 (34%)	0,0271
<i>Pfálps</i>	A437+G437	1/23 (4,34%)	2/14 (14,29%)	0,28	3/27 (11,11%)	13/36 (36,11%)	0,02382	4/50 (8%)	15/50 (30%)	0,00512
<i>Pfálps</i>	K540	23/23 (100%)	14/14 (100%)	≥0,05	27/27 (100%)	36/36 (100%)	≥0,05	50/50 (100%)	50/50 (100%)	≥0,05
<i>Pfálps</i>	E540	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0,05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0,05	0	0	≥0,05
<i>Pfálps</i>	K540+ E540	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0,05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0,05	0	0	≥0,05
<i>Pfálps</i>	A581	23/23 (100%)	14/14 (100%)	≥0,05	27/27 (100%)	36/36 (100%)	≥0,05	50/50 (100%)	50/50 (100%)	≥0,05
<i>Pfálps</i>	G581	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0,05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0,05	0	0	≥0,05
<i>Pfálps</i>	A581+ G581	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0,05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0,05	0	0	≥0,05
<i>Pfálps</i>	A613	21/23 (91,30%)	14/14 (100%)	0,25848	26/27 (96,29%)	36/36 (100%)	≥0,05	46/50 (92%)	49/50 (98%)	0,16758
<i>Pfálps</i>	T/S613	1/23 (3,33%)	0/14 (0%)	0,42952	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0,05	2/50 (4%)	0	0,15272
<i>Pfálps</i>	A613+T/S613	1/23 (3,33%)	0/14 (0%)	0,42952	1/27 (3,7%)	0/36 (0%)	0,24604	2/50 (4%)	1/50 (2%)	0,5552
<i>Pfálhr</i>	N51	0/23 (0%)	4/14 (28,57%)	0,00672	0/27 (0%)	4/36 (11,12%)	0,07346	0	09/50(18%)	0,00168
<i>Pfálhr</i>	51I	20/23 (86,95%)	4/14 (28,57%)	0,0003	27/27 (100%)	22/36 (61,12%)	0,00024	47/50 (94%)	37/50 (74%)	0,00634
<i>Pfálhr</i>	51	3/23 (13,04%)	6/14 (42,86%)	0,04036	0/27 (0%)	10/36 (27,78%)	0,00278	3/50 (6%)	04/50 (08%)	0,69654
<i>Pfálhr</i>	C59	0/23 (0%)	4/14 (22,57%)	0,00672	1/27 (3,70%)	8/36 (22,22%)	0,03752	1/50 (2%)	19/50 (38%)	0
<i>Pfálhr</i>	59R	20/23 (86,95%)	4/14 (22,57%)	0,0003	26/27 (96,29%)	18/36 (50%)	0,0001	46/50 (92%)	24/50 (48%)	0
<i>Pfálhr</i>	59	3/23 (13,04%)	6/14 (42,86%)	0,04036	0/27 (0%)	10/36 (27,78%)	0,0088	3/50 (6%)	07/50 (14%)	0,18352
<i>Pfálhr</i>	S108	0/23 (0%)	5/14 (35,71%)	0,00208	0/27 (0%)	2/36 (5,55%)	0,21498	0	07/50 (14%)	0,00614
<i>Pfálhr</i>	N108	22/23 (95,65%)	9/14 (64,29%)	0,01208	27/27 (100%)	29/36 (80,56%)	0,0151	49/50 (98%)	35/50 (70%)	0,00014
<i>Pfálhr</i>	108	1/23 (4,35%)	0/14 (0%)	0,42952	0/27 (0%)	5/36 (13,89%)	0,04338	1/50 (2%)	08/50 (16%)	0,01428

Les données de génotypage *mcp-1* et *mcp-2* ont été combinées avec ceux du génotypage des allèles des gènes *Pfálhr* et *Pfálps* pour déterminer la prévalence des mutations au niveau de chaque codon et au niveau des infections monoclonales et polyclonales. Le test Z pour deux proportions de population a été utilisé pour comparer la prévalence des allèles dans chaque pays. Le test est significatif si la p-value est inférieure à 0,05.

Tableau XI : Prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et en Tanzanie en fonction du nombre d'allèles par échantillon

	Allèles	Nombre d'allèles par génotype (%)		
		Sénégal	Tanzanie	P value
<i>Pfdhps</i>	A437	27/80 (33,75%)	42/103 (40,78%)	0,9729
	G437	45/80 (56,25%)	39/103 (37,86%)	0,0131
	Indéterminé	8/80 (10%)	22/103 (21,36%)	
<i>Pfdhps</i>	K540	80/80 (100%)	103/103 (100%)	>0,05
	E540	0/80 (0%)	0/103 (0%)	>0,05
	Indéterminé	0/80 (0%)	0/103 (0%)	
<i>Pfdhps</i>	A581	80/80 (100%)	103/103 (100%)	>0,05
	G581	0/80 (0%)	0/103 (0%)	>0,05
	Indéterminé	0/80 (0%)	0/103 (0%)	
<i>Pfdhps</i>	A613	75/80 (3,75%)	100/103 (97,09%)	0,2713
	T/S613	2/80 (2,5%)	0/103 (0%)	0,1074
	Indéterminé	3/80 (3,75%)	3/103 (2,91%)	
<i>Pfdhfr</i>	N51	0/80 (0%)	21/103 (20,39%)	0
	51I	77/80 (96,25%)	67/103 (65,05%)	0
	Indéterminé	3/80 (3,75%)	15/103 (14,56%)	
<i>Pfdhfr</i>	C59	1/80 (1,25%)	32/103 (31,07%)	0
	59R	76/80 (95%)	56/103 (54,37%)	0
	Indéterminé	3/80 (3,75%)	15/103 (14,56%)	
<i>Pfdhfr</i>	S108	0/80 (0%)	16/103 (15,5%)	0,0002
	N108	79/80 (98,75%)	87/103 (84,5%)	0,0096
	Indéterminé	1/80 (1,25%)	0/103 (0%)	
	Infections Polyclonales	27/50 (54%)	36/50 (72%)	0,0628
	Multiplicité des infections	78/50 (1,56)	103/50 (2,06)	

Le nombre de génotypes parasitaires par patient a été calculé pour estimer les fréquences d'allèles sauvages et mutantes dans les infections mixtes. Pour chaque codon nous avons estimé le nombre d'allèles sauvage et mutant après avoir déterminé par génotypage des gènes *msh1* et *msh2* le nombre d'allèles présent dans un échantillon. Cependant, si un patient, par exemple, présente une infection mixte avec 4 clones, le résultat a été défini comme indéterminé : car on peut avoir 1 type sauvage et 3 mutants ; ou 2 Sauvages et 2 Mutants ; ou 3 Sauvages et 1 Mutant.

Tableau XII : Prévalence de la simple, double, triple, quadruple et quintuple mutation au Sénégal et en Tanzanie

	Simple Mutation (%)	Double Mutation (%)	Triple Mutation (%)	Quadruple Mutation (%)	Quintuple mutation (%)
Sénégal	20	22	44	52	0
Tanzanie	2	2	48	58	0
P value	0,01	0,005	0,84	0,7	0

Les allèles mutants des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* ont été combinés pour déterminer la Simple mutation (S108N), la double mutation (*Pfdhfr* C59R / S108N), la triple mutation (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N), la quadruple mutation (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N et *Pfdhps* A437G) et la quintuple mutation (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N et *Pfdhps* A437G / K540E).

III. Discussion

La résistance aux antipaludiques reste un obstacle majeur aux efforts d'élimination du paludisme dans les pays endémiques. Ainsi, le développement d'outils simples, rapides, fiables et flexibles, permettra d'identifier et de mieux suivre les marqueurs moléculaires associés à la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques. Cette étude a évalué la sensibilité et la spécificité de la HRM par rapport à la PCR-RFLP dans la détection des infections à *P. falciparum* dans deux sites à endémicité et intensité de transmission distincte : Mlandizi (Tanzanie) et Thiès (Sénégal).

La PCR-RFLP et la HRM peuvent classer les allèles comme type sauvage, type mutant ou mixte.

Cependant, la PCR-RFLP est laborieuse, prend du temps et nécessite une enzyme de restriction spécifique pour chaque SNP. Cette méthode nécessite également la séparation des produits de PCR sur un gel, ce qui prend souvent des heures, augmente le risque de contamination et rend difficile le génotypage d'un grand nombre d'échantillons. En outre, l'interprétation des profils de digestion peut être subjective en cas d'une digestion sous-optimale, d'une faible quantité d'ADN, de faibles produits de PCR. Par contre, la HRM est une méthode de génotypage Simple, rapide, précise, sensible et spécifique qui détecte des variations de séquences dans les produits de PCR. Cette technique peut également détecter des allèles mineurs dans une population de génotypes mixtes.

Ainsi, dans cette étude la HRM a identifié plus de génotypes mixtes que la PCR-RFLP au niveau des codons N51I ($p = 0,005$), C59R et S108N en Tanzanie.

Au Sénégal, un pays avec moins d'infections polyclonales, aucune infection mixte n'a été révélée par PCR-RFLP. Par contre, la HRM a pu détecter des infections mixtes, bien que la différence n'était pas statistiquement significative (Tableau IX). Comme la PCR-RFLP peut ne pas détecter des clones qui sont à faible fréquence dans une population mixte, en raison de la nature qualitative de la méthode, un allèle mineur pourrait facilement passer inaperçu. Par contre, la HRM a détecté des infections mixtes dans les deux populations, suggérant que la HRM est plus sensible que la PCR-RFLP dans la détection des sous-populations mineures. Cette capacité de la HRM à détecter des polymorphismes connus et nouveaux ainsi que sa précision, sa sensibilité et sa spécificité ont été décrites par des études antérieures (Andriantsoanirina *et al.*, 2009 ; Gan *et al.*, 2010 ; Cruz *et al.*, 2010 ; Reed *et al.*, 2004 ; 2007 ; Daniels *et al.*, 2012).

Par ailleurs, dans les pays comme le Sénégal avec peu d'infections polyclonales et une faible MOI, il peut ne pas y avoir de différence significative entre les deux techniques.

Par contre, une sensibilité et une capacité à détecter des allèles mineurs, est plus marquée dans les populations avec une forte prévalence d'infections polyclonales et une MOI plus élevée comme celle de la Tanzanie.

Par conséquent, la HRM est la méthode la plus attrayante pour le génotypage des échantillons dans les deux pays, mais surtout dans les pays comme la Tanzanie caractérisée par une fréquence élevée d'infections mixtes. La capacité à détecter de rares et faibles fréquences des allèles de résistance aux médicaments est importante pour la surveillance de ces marqueurs lorsque la pression médicamenteuse s'applique et est susceptible de sélectionner de telles variantes.

Etant donné que la HRM était considéré comme la méthode la plus sensible, elle a été exclusivement utilisée pour le génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* afin de déterminer les profils de résistance aux médicaments dans les deux pays.

Ainsi, la fréquence des allèles mutants au niveau des codons N51I, C59R et S108N du gène *Pfdhfr* et du codon A437G du gène *Pfdhps*, était élevée au Sénégal et en Tanzanie. Des fréquences élevées de mutations ont aussi été observées dans une étude menée à Dakar (Sénégal) (Wurtz *et al.*, 2012) et en Tanzanie (Baraka *et al.*, 2015). Ces prévalences de mutations élevées au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, observées dans notre étude, pourraient être expliquées par l'utilisation de la SP comme traitement de deuxième ligne contre le paludisme au Sénégal et en première ligne en Tanzanie au moment de la collecte des échantillons. En outre, la SP est utilisée pour le TPI chez les femmes enceintes. Elle est également utilisée en association avec l'amodiaquine pour la chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants au Sénégal depuis 2003. Il est possible que l'utilisation continue de la SP favorise la sélection de mutations dans ces zones, contribuant ainsi à la prévalence élevée des allèles mutants observés dans cette étude. Par contre, aucune mutation n'a été identifiée au niveau des codons K540E et A581G du gène *Pfdhps* au Sénégal et en Tanzanie. Par conséquent, la SP peut continuer à être utilisée pour le traitement préventif intermittent chez les femmes enceintes dans les deux pays.

Par ailleurs, les mutations au niveau des codons N51I, C59R et S108N du gène *Pfdhfr* et du codon A437G du gène *Pfdhps* étaient plus fréquentes au Sénégal qu'en Tanzanie. En effet, il a été observé dans certaines études que les résistances émergent plus facilement dans les zones à faible transmission par rapport aux zones à forte transmission (White, 2004), ce qui est cohérent avec les résultats de cette étude.

Cependant, un potentiel facteur de confusion pour les allèles résistants plus fréquents au Sénégal qu'en Tanzanie est la différence de la MOI entre les deux sites.

Comme beaucoup d'infections en Tanzanie sont polyclonales et contiennent une MOI élevée, il est possible que le nombre d'allèles mutants circulant dans la population soit sous-estimé étant donné que les deux techniques PCR-RFLP et HRM peuvent classer les allèles comme type mutant ou sauvage mais ne peuvent pas déterminer le nombre d'allèles pour chaque génotype (elles donnent juste le profil de la population totale : tous sont de types sauvages, mutants, ou mixtes). Pour relever ce défi, les données de génotypage *msh-1* et *msh-2* ont été combinées avec le génotypage des allèles de résistance aux médicaments pour déterminer le nombre d'allèles de types sauvages ou mutants.

Lorsque l'on tient compte de la fréquence des allèles sur la base du nombre d'allèles parasitaires, les résultats ne changent pas significativement car les allèles mutants sont encore plus élevés au Sénégal qu'en Tanzanie.

Par ailleurs, les études rapportent des combinaisons de mutations au niveau des deux gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* comme un moyen de comparaison avec les directives de l'OMS, pour examiner la continuité de l'utilisation de la SP. Lors de la combinaison des allèles mutants, la simple mutation (*Pfdhfr* S108N) et la double mutation (*Pfdhfr* C59R / S108N) étaient significativement plus représentées au Sénégal qu'en Tanzanie avec respectivement $p = 0,01$ et $p = 0,005$. La triple et quadruple mutations n'étaient pas significativement différentes entre les deux sites, bien qu'elles soient élevées dans les deux pays.

Il est encourageant de noter que la quintuple mutation, (*Pfdhfr* N51I / C59R / S108N et *Pfdhps* A437G / K540E) fortement associée à la résistance *in vivo* et *in vitro* à la SP en Afrique orientale et australe (Bwijo *et al.*, 2003 ; Roper *et al.*, 2003), n'a pas été observée dans notre étude. Cette absence de la quintuple mutation a été notée dans des études antérieures menées au Sénégal par Ndiaye *et al.* (Ndiaye *et al.*, 2005 ; 2013) et Wurtz *et al.* (Wurtz *et al.*, 2012). Cependant, une étude récente menée au Sénégal a trouvé un seul échantillon avec la quintuple mutation, soit une prévalence de 1,1% de la population (Boussaroque *et al.*, 2016). À la lumière de ce résultat, une surveillance continue et constante des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments est essentielle.

Conclusion

Ces résultats démontrent une sensibilité élevée du test HRM dans la détection des allèles mineurs par rapport à la PCR-RFLP dans des échantillons provenant de deux pays endémiques avec différents niveaux d'infections palustres.

En somme, la Tanzanie a montré une MOI plus élevée par rapport au Sénégal. Les mutations au niveau du gène *Pfdhfr* étaient plus fréquentes parmi les échantillons du Sénégal qu'à ceux de la Tanzanie.

Sur la base de la fréquence des allèles mutants et de l'absence de la quintuple mutation prédictive de la résistance à la SP dans ces populations, ces données indiquent que la SP reste efficace pour les TPIg et la CPS selon les recommandations de l'OMS.

**ETUDE N°2 : Etude de la résistance
de *Plasmodium falciparum* à partir de
l'ADN extrait des TDR collectés au
Sénégal et aux Comores**

RESEARCH

Open Access



RDTs as a source of DNA to study *Plasmodium falciparum* drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands

Nasserdine Papa Mze^{1*}, Yaye Die Ndiaye², Cyrille K. Diedhiou¹, Silal Rahamatou³, Baba Dieye², Rachel E. Daniels⁴, Elizabeth J. Hamilton⁵, Mouhamadou Diallo¹, Amy K. Bei^{1,4}, Dyann F. Wirth^{4,6}, Souleymane Mboup¹, Sarah K. Volkman^{4,6,7}, Ambroise D. Ahouidi^{1†} and Daouda Ndiaye^{2†}

Introduction

L'Organisation mondiale de la santé a recommandé des tests de diagnostic rapide (TDR) pour le diagnostic des cas suspects de paludisme. En effet, les TDR peuvent améliorer considérablement la qualité de la prise en charge des infections palustres, notamment dans les zones reculées ayant un accès limité à des services d'examen microscopiques de bonne qualité. En outre, les TDR qui ont l'avantage d'être simples d'usage, permettent de rendre les résultats dans un délai relativement court (moins de 20 minutes). Ces techniques sont basées sur la détection des antigènes spécifiques de *Plasmodium spp* dans le sang à partir d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une ou de plusieurs espèces de *Plasmodium*. Les espèces plasmodiales détectées et stockées dans ces TDR, peuvent être extraites pour des études génétiques. Le fait d'avoir de l'ADN à partir des TDR pourrait rendre inutile la collecte d'échantillons de sang total ou de sang sur papier filtre. En plus, l'ADN obtenu des TDR pourrait également être utilisé pour le contrôle de la qualité des TDR déployés dans les sites endémiques.

Les TDR créent une ressource précieuse pour la génomique, puisqu'il a été démontré que l'ADN peut être extrait à partir des TDR (Veron *et al.*, 2006 ; Cnops *et al.*, 2011 ; Ishengoma *et al.*, 2011 ; Morris *et al.*, 2013).

Pour valider la faisabilité de l'extraction d'ADN à partir des TDR collectés sur le terrain, pour des études moléculaires, nous avons choisi deux marqueurs génétiques impliqués dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP, Fansidar®) : les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*. Bien que cette molécule ait connu une baisse relative de son efficacité thérapeutique, elle est actuellement utilisée au Sénégal pour le traitement préventif intermittent (TPI), chez les femmes enceintes et chez les enfants ; et aux Comores pour le TPI, uniquement chez les femmes enceintes.

Si plusieurs études sur la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* résistants à la SP ont été faites au Sénégal (Ndiaye *et al.*, 2005 ; Henry *et al.*, 2006 ; Faye *et al.*, 2011 ; Daniels *et al.*, 2012 ; Ndiaye *et al.*, 2013), en revanche peu d'études ont été réalisées aux Comores (Randrianarivelojosia *et al.*, 2004 ; Tall *et al.*, 2007 ; Rebaudet *et al.*, 2010).

Ainsi, les objectifs de cette étude étaient (1) d'évaluer la possibilité de l'extraction d'ADN à partir des TDR collectés sur le terrain, et (2) de déterminer les mutations des gènes *Pfdhfr* (S108N, N51I, C59R et I164L) et *Pfdhps* (A437G, S436F, K540E, A581G et A613T / S) au Sénégal et aux Comores, en utilisant la méthode de fusion à haute résolution ou (HRM). Par ailleurs, nous avons utilisé le génotypage du gène *msp 1* et *msp 2* comme outil, pour comparer la multiplicité des infections entre les deux pays.

I. Matériel et méthodes

I.1. Site d'étude et de collecte des échantillons

Les TDR utilisés pour cette étude ont été collectés en Grande Comore en 2012 et 2013, dans la ville de Moroni où la transmission du paludisme est hypo-endémique ; et dans deux autres villes, Mitsamiouli et Mbeni où la transmission du paludisme est respectivement méso-endémique et méso voire hyperendémique (Rebaudet *et al.*, 2010).

Au Sénégal, les TDR ont été collectés à Thiès, au Service de Lutte Anti-Parasitaire (SLAP).

I.2. Tests de diagnostics rapides et extraction de l'ADN parasite

Au Sénégal, le test rapide SD BIOLINE (SD Bioline, 05FK50), qui détecte seulement le *P. falciparum* a été utilisé. Aux Comores, deux tests différents ont été utilisés : le test rapide pLDH / HRP2 Combo (accès Bio, PBX-KM30003) et le test rapide SD BIOLINE Ag Pf / Pan (SD Bioline, 05FK60).

Pour l'extraction d'ADN, c'est la partie proximale de la membrane de nitrocellulose qui a été choisie, comme il a été décrit par Cnops *et al.* (2011). L'ADN a été extrait en utilisant le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen), selon les recommandations fournies par le fabricant. Au total, 204 échantillons (124 de la Grande Comore et 80 de Thiès) ont été extraits et génotypés.

I.3. Génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* par "High Resolution Melting"

L'analyse des mutations des gènes *Pfdhfr* (au niveau des codons N51I, C59R, S108N et I164L) et *Pfdhps* (au niveau des codons S436F, A437G, K540E, A581G et A613T / S) a été faite par la méthode de fusion à haute résolution (HRM), en utilisant le Light Scanner LS-32, selon la méthodologie précédemment publiée par Daniels *et al.* (2012). Le protocole d'amplification des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* a été décrite dans le chapitre 1.

I.4. Séquençage d'ADN

Le séquençage (Sanger séquençage) du gène *Pfdhps* du codon 436/437, a été effectué en utilisant les amorces utilisées par Daniels (Daniels *et al.*, 2012).

I.5. Génotypage des allèles des gènes *msp 1* et *msp 2*

Les régions polymorphes (bloc 2 de *msp 1* et bloc 3 de *msp 2*) ont été amplifiées en utilisant la méthode de Snounou *et al.* (Snounou *et al.*, 1999). Toutes les réactions de PCR ont été effectuées selon le même protocole utilisé dans le chapitre 1.

I.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le Z-test pour deux proportions de deux populations distinctes (disponible en ligne sur Epitools.ausvet.com), pour comparer la prévalence des allèles mutants entre les échantillons des Comores et du Sénégal. Le seuil de signifiante a été estimé à $\alpha = 0,05$.

II. Résultats

II.1. Résultats de l'analyse de l'ADN extrait à partir des TDR

L'ADN extrait à partir des TDR a été analysé par HRM et PCR nichée. Parmi les 204 échantillons utilisés pour le génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, 201 échantillons ont donné un génotypage complet (124 pour la Grande Comore et 77 pour Thiès) et 3 échantillons ont été déclarés négatifs par HRM.

Pour le génotypage par PCR nichée des gènes *msp1* et *msp2*, 200 échantillons ont été amplifiés avec succès (123 pour la Grande Comore et 77 pour Thiès) et 4 échantillons n'ont pas pu être amplifiés (Tableau XIII).

Tableau XIII : Nombre de TDR ayant donné un résultat positif ou négatif après extraction

Les Kits des TDR	Nombre TDR	HRM ^a positive	HRM ^a négative	PCR ^b positive	PCR ^b négative	Fragment de TDR
SD BIOLINE malaria						
Rapid test pf	80	77	3	77	3	1/3 NC
SD Bioline Malaria Ag Pf/Pan						
Malaria pLDH/HRP2	13	13	0	13	0	1/3 NC
Combo						
Total	204	201 ^c	3	200	4	-

^a La méthode de HRM a été utilisée pour le génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*.

^b La PCR nichée a été utilisée pour amplifier les gènes *msp1* et *msp2*.

^c Pour les codons N51I/C59R, seulement 62 échantillons de Thiès et 96 échantillons de la Grande Comore ont donné un génotypage complet.

II.2. Prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* à Thiès et en Grande Comore

À Thiès, pour le gène *Pfdhfr*, 90% (54/60) des échantillons, avaient un allèle mutant I51 / R59 et 95,8% (68/71), un allèle mutant N108. Pour le gène *Pfdhps*, 1,33% (1/75) des échantillons, avait la mutation A613T et 53,9% (41/76) la mutation A437G. Au niveau du codon S436F, ce sont 12% (9/77) des échantillons qui avaient un allèle mutant F436. Cette mutation a été caractérisée par Daniels et *al.* (Daniels *et al.*, 2012). Aucune mutation n'a été observée pour les codons I164L, K540E et A581G. En outre, nous avons trouvé par HRM de nouvelles mutations au niveau des codons S436F / A437G du gène *Pfdhps* (Figure 13 A). Ces mutations ont ensuite été confirmées par séquençage 436Y / 437A (Figure 14).

En Grande Comore, 93,4% (115/123) des échantillons avaient l'allèle mutant N108, 62,5% (60/96) avaient l'allèle mutant I51 et 69,8% (67/96) avaient l'allèle mutant R59 au niveau du gène *Pfdhfr*. Pour le gène *Pfdhps*, 29,8% (37/124) des échantillons avaient la mutation G437. Par contre, les autres codons I164L, K540E, A581G, A613T et S436F) avaient 100% d'échantillons de type sauvage.

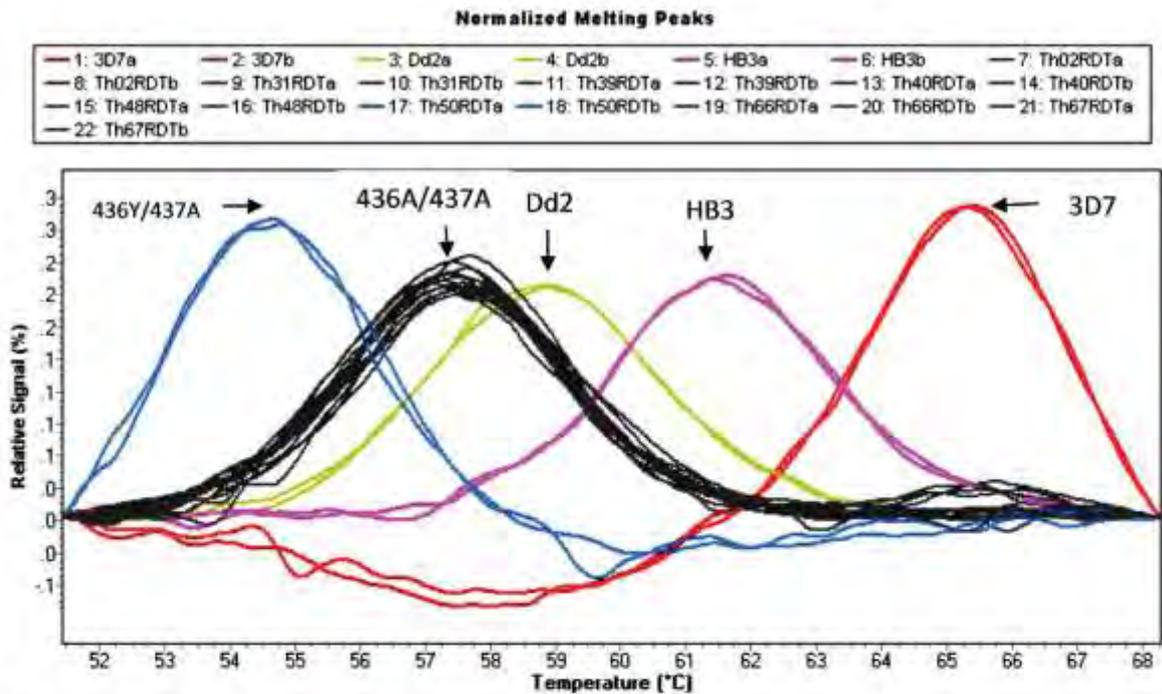
En comparant les prévalences des mutations entre les deux pays, nous avons observé une différence significative pour le gène *Pfdhfr* au niveau des codons N51I (0,0001) et C59R ($p = 0,003$) et pour le gène *Pfdhps* au niveau des codons S436F ($p = 0,0001$) et A437G ($p = 0,0007$).

En outre, les prévalences des mutations obtenues au niveau des gènes *Pfdhfr* (codons N51I, C59R et S108N) et *Pfdhps* (codons S436F et A437G) étaient plus élevées à Thiès par rapport à la Grande Comore.

La simple mutation S108N était présente dans 1,6% (2/122) des échantillons en Grande Comore. Par contre, cette simple mutation n'a pas été trouvée à Thiès. La prévalence de la double mutation (*Pfdhfr* C59R et S108N) était de 9% (6/67) à Thiès, et de 25,4% (31/122) en Grande Comore. Pour la triple mutation (*Pfdhfr* S108N, N51I, et C59R), les deux pays avaient des prévalences similaires: 44,3% (28/122) en Grande Comore et 42% (28/67) à Thiès. Cependant, la quadruple mutation (*Pfdhfr* S108N, N51I, C59R, et *Pfdhps* A437G) a été observée avec une fréquence de 28,7% (35/122) en Grande Comore et 49% (33/67) à Thiès. Pour la quintuple mutation (*Pfdhfr* S108N / N51I / C59R et *Pfdhps* A437G / K540E) aucune mutation n'a été trouvée dans les deux pays. En analysant ces combinaisons de mutations dans les deux pays, nous n'avons pas trouvé de différence significative pour la prévalence de la simple ($p = 0,29$) et de la triple mutation ($p = 0,74$). Par contre, une différence significative entre la prévalence de la double ($p = 0,0063$) et de la quadruple mutation ($p = 0,0048$) a été observée dans les deux pays (Figure 15).

Par ailleurs, pour les infections mixtes (allèle mutant et allèle sauvage) nous avons obtenu plus de mixtes en Grande Comore qu'à Thiès. Ainsi, pour le codon S108N, nous avons trouvé 4 échantillons mixtes (3%) en Grande Comore et 3 mixtes (4%) à Thiès. Pour le codon A437G, il y avait 5 mixtes (4%) en Grande Comore et 2 mixtes (2,6%) à Thiès. Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre les allèles mixtes du codon S108N du gène *Pfdhfr* ($p = 0,77$) et du codon A437G du gène *Pfdhps* ($p = 0,60$). Par contre, pour les codons N51I / C59R une différence significative a été observée. En Grande Comore, 27 mixtes (28%) ont été observés, alors qu'à Thiès 6 mixtes (9%) ont été trouvés ($p = 0,003$).

A



B

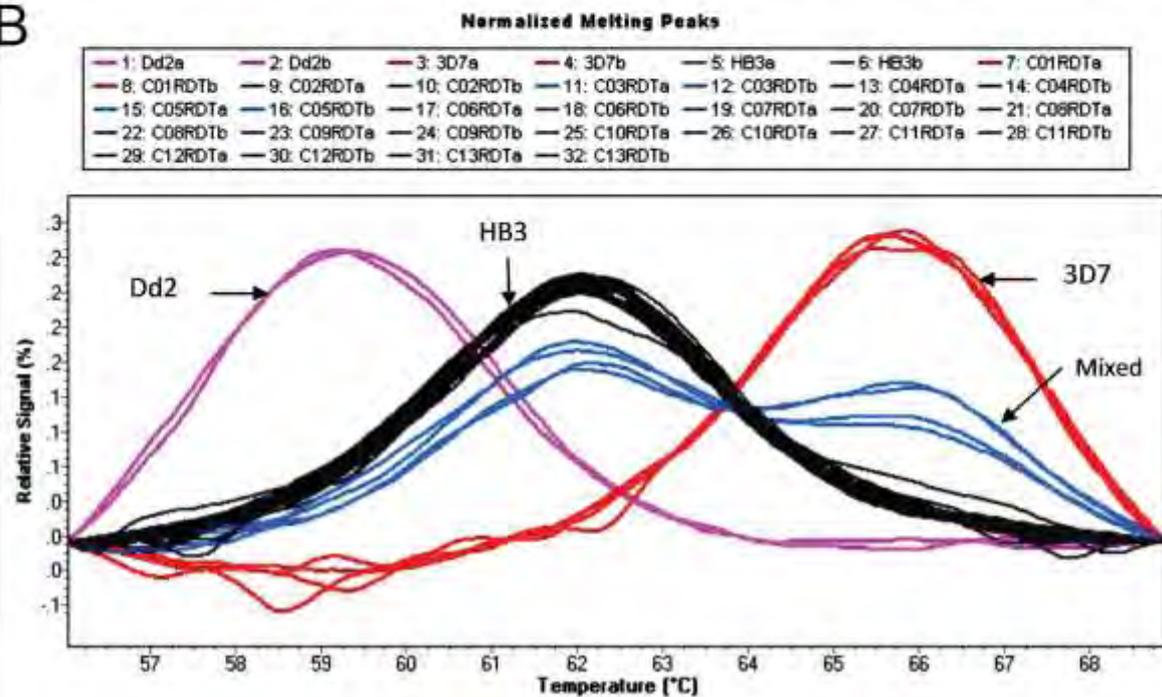


Figure 13 : Présentation des pics des profils sauvages et mutants du gène *Pfdhps* 436/437.

(A) Le pic 3D7 représente le profil sauvage au niveau du codon 436 et le profil mutant pour le codon 437. Le pic Dd2 représente le profil mutant pour les deux codons 436/437. Le pic HB3 représente le profil sauvage des deux codons (436 et 437). Les pics 436A / 437A, correspondent aux mutations trouvées par Daniel et *al.* (2012) au Sénégal. Le pic 436Y / 437A est l'échantillon Th50RDT représentant la nouvelle mutation.

(B) Les pics C03 et C05 représentent des échantillons mixtes (mutants + sauvages). Le pic Dd2 représente le profil mutant pour les deux codons 436/437. Le pic HB3 représente le profil sauvage des deux codons 436/437. Le pic 3D7 représente le profil sauvage au niveau du codon 436 et le profil mutant pour le codon 437.

A

```

3D7   TTATAGATATAGGTGGAGAATCCTCTGGTCCTTTTGTATACCTAAT
      ::::::::::::::::::::::::::::
TH50  TTATAGATATAGGTGGAGAATCCTTATGCTCCTTTTGTATACCTAAT

```

B

```

3D7   MFEMINEGASVIDIGGESSGPFVIPNPKISERDLVVPVLQLF
      ::::::::::::::::::::
TH50  MFEMINEGASVIDIGGESYAPFVIPNPKISERDLVVPVLQLF

```

Figure 14 : Séquençage de l'échantillon Th050. A : ADN ; B : l'acide aminé

Le séquençage a été réalisé, pour confirmer le génotypage du nouveau profil obtenu à partir de la HRM. Après alignement des séquences des nucléotides, nous avons trouvé des nouvelles mutations 436Y / 437A du gène *Pfdhps*. Le codon TAT correspondant à la tyrosine (Y) et le codon GCT correspondant à l'alanine (A).

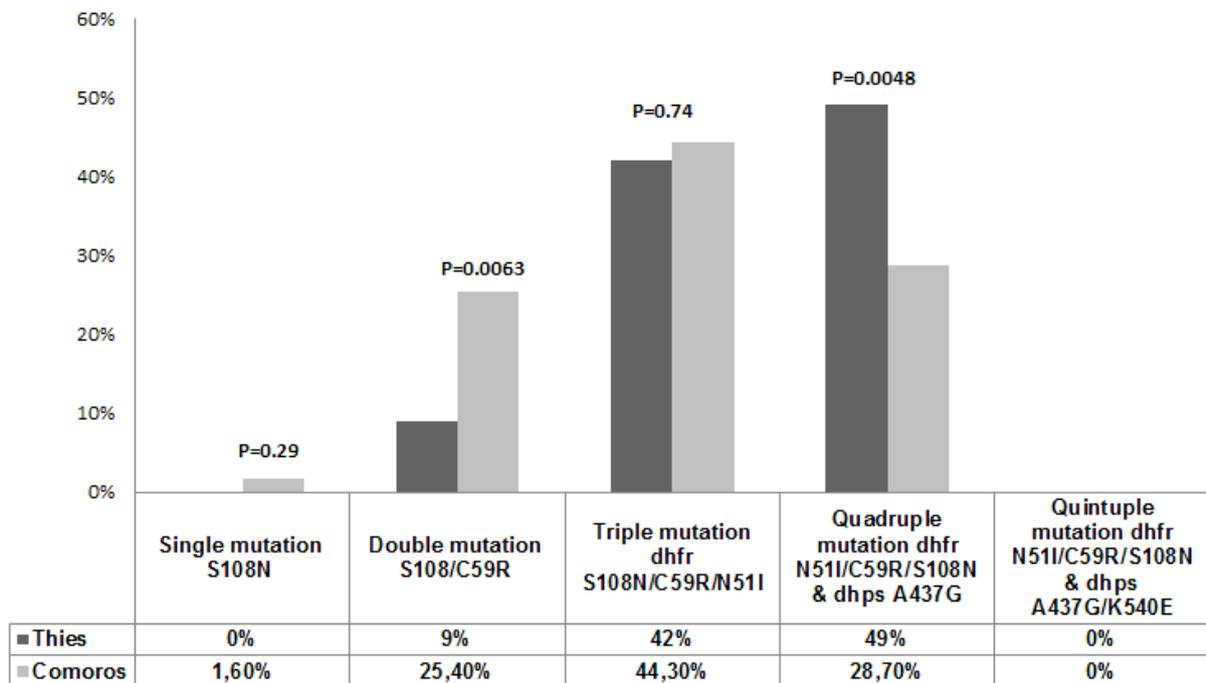


Figure 15 : Prévalence de la simple, double, triple, quadruple et quintuple mutation, aux Comores et au Sénégal. La prévalence de la simple mutation a été déterminée en comptant le nombre des mutants présents seulement au niveau du codon S108N. La double (S108N / C59R), la triple (N51I / C59R / S108N), la quadruple (N51I / C59R / S108N / A437G) et la quintuple (N51I / C59R / S108N / A437G / K540E) mutation, ont été aussi déterminées de la même façon.

II.3. Résultats du géotypage des gènes *msp 1* et *msp 2*

Etant donné que les deux pays ont des niveaux d'endémicité différents, nous avons amplifiés les gènes *msp1* et *msp2* pour déterminer la multiplicité des infections (MOI) dans les deux pays. A Thiès, les infections polyclonales étaient présentes dans 36 échantillons (64,2%). La multiplicité des infections (MOI) était de 1,57.

En Grande Comore, 42 échantillons (43,7%) présentaient l'infection polyclonale. La multiplicité des infections (MOI) était de 1,47.

III. Discussion

Cette étude a évalué la faisabilité de l'extraction de l'ADN à partir des TDR collectés sur le terrain et la fréquence des marqueurs associés à la résistance à la sulfadoxine-Pyriméthamine à Thiès (Sénégal) et en Grande Comore (Comores).

En effet des études antérieures ont montré qu'il est possible d'extraire de l'ADN plasmodial à partir des TDR (Veron *et al.*, 2006 ; Cnops *et al.*, 2011 ; Ishengoma *et al.*, 2011 ; Morris *et al.*, 2013). Cependant, il existe de nombreux facteurs qui peuvent influencer l'efficacité de l'extraction d'ADN à partir des TDR. Parmi ces facteurs, il y a le volume de sang à utiliser et les conditions de stockage, qui peuvent différer d'un milieu à un autre. Un autre facteur à considérer, est la proportion d'ADN humain par rapport à l'ADN du *Plasmodium*, puisque la capacité d'un TDR à détecter des antigènes spécifiques du *Plasmodium*, dépendra de la concentration de l'ADN plasmodial.

Compte tenu de toutes ces contraintes, nous avons cherché à savoir si effectivement les TDR collectés sur le terrain, peuvent servir de source d'ADN pour des études génomiques. Une telle investigation serait utile surtout chez des populations où des échantillons de sang total ou de papiers filtres ne sont pas disponibles ou difficiles d'accès. Notre étude confirme l'intérêt de l'utilisation des TDR comme sources de matériel génétique, pour effectuer des études moléculaires.

Ainsi, pour déterminer la faisabilité d'une étude génomique à partir de l'ADN extrait des TDR, nous avons utilisé la méthode HRM pour déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* et la PCR nichée pour déterminer la multiplicité des infections (MOI) à partir des gènes *msh1* et *msh2*. Les résultats obtenus par le génotypage des gènes *msh1* et *msh2*, nous ont permis de comparer la MOI entre la Grande Comore (où le paludisme est méso voire hyper-endémique) et Thiès (où le paludisme est hypo-endémique). Une différence non significative a été observée, bien que la transmission du paludisme soit plus élevée en Grande Comore, par rapport à Thiès.

Nous avons trouvé une nouvelle mutation (436Y / 437A) au niveau du gène *Pfdhps* dans un échantillon de Thiès (Figure 13A).

Par ailleurs, en comparant nos résultats obtenus à Thiès à partir de l'ADN des TDR, avec ceux obtenus par Daniels *et al.* (Daniels *et al.*, 2012), à partir de l'ADN extrait des papiers filtres collectés à Thiès, nous avons trouvé des fréquences de mutations similaires pour le gène *Pfdhfr* au niveau des codons N51I, C59R et S108N et pour le gène *Pfdhps* au niveau du codon A437G.

Cependant, très peu d'étude sur ces marqueurs moléculaires ont été réalisées aux Comores (Rebaudet *et al.*, 2010 ; Tall *et al.*, 2007). Ainsi, dans notre étude nous avons également trouvé des prévalences élevées de mutations au niveau des codons N51I (62,5%), C59R (69,76%) et S108N (93%) du gène *Pfdhfr* et du codon A437G (29,8%) du gène *Pfdhps*.

Cette prévalence élevée des mutations aux Comores pourrait être expliquée par l'utilisation de la SP pour le TPIg et pour le traitement du paludisme simple (RPP, 2011). Une autre explication pourrait être l'utilisation massive de la triméthoprime-sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole® ou Bactrim) aux Comores. Ce médicament, similaire à la SP a la possibilité de sélectionner des mutants qui lui sont résistants (Anglaret *et al.*, 2001 ; Whitty *et al.*, 2002). Par ailleurs, la quintuple mutation *Pfdhfr* 51I / 59R / 108N + *Pfdhps* 437G / 540E, qui est une mutation fortement associée à l'échec clinique de la SP (Talisuna *et al.*, 2004 ; McCollum *et al.*, 2012) n'a été observée, ni en Grande Comore ni à Thiès, au Sénégal. Par conséquent, la SP peut continuer à être utilisée pour le TPIg comme il a été recommandé par l'OMS (OMS, 2009). Ces résultats suggèrent que le suivi de la résistance à la SP aux Comores, doit être une priorité.

Conclusion

Nous avons montré que l'ADN extrait des TDR, peut être une source utile pour des études moléculaires et génétiques. L'ADN extrait des TDR peut également être une alternative lorsque le sang séché sur des papiers filtres ou le sang veineux n'est pas disponible ou difficile d'accès. Par ailleurs, des prévalences de mutations élevées ont été trouvées au niveau des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*. Il est important de continuer la surveillance de la résistance de *P. falciparum* face aux médicaments antipaludiques, au Sénégal et aux Comores.

**ETUDE N°3 : Changements
temporels de *Plasmodium falciparum*
reticulocyte binding protein
homologue 2b (*PfRh2b*) au Sénégal et
en Gambie**

RESEARCH

Open Access

Temporal changes in *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 2b (*PfRh2b*) in Senegal and The Gambia



Cyrille K. Diédhiou^{1,2}, Rahama A. Moussa¹, Amy K. Bei^{2,3,4}, Rachel Daniels¹, Nasseridine Papa Mze^{1,2}, Daouda Ndiaye⁴, Ngor Faye⁵, Dyann Wirth³, Alfred Amambua-Ngwa⁶, Souleymane Mboup¹ and Ambroise D. Ahouidi^{1,2*} 

Introduction

Malgré les efforts considérables et les progrès importants en matière de prévention et de lutte contre le paludisme, l'infection à *Plasmodium falciparum* demeure un défi majeur pour la santé mondiale. Cela est dû à plusieurs facteurs y compris la résistance aux insecticides chez les anophèles vecteurs, l'émergence et la propagation rapide de souches résistantes aux antipaludiques et surtout l'absence d'un vaccin efficace. Par conséquent, la mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme reste essentielle pour l'élimination du paludisme.

Cependant, les efforts déployés pour développer un vaccin antipaludique ont été entravés par une diversité génétique considérable chez les populations de parasites et une immunité variable contre certains allèles chez les populations humaines (Genton *et al.*, 2002 ; Takala *et al.*, 2006). La caractérisation du polymorphisme génétique des principaux antigènes vaccinaux de *P. falciparum* permettra une meilleure compréhension de l'évolution moléculaire des populations de parasites qui pourrait influencer sur l'efficacité des futurs vaccins (Neafsey *et al.*, 2015).

Les protéines PfRh sont exprimées à la surface apicale du mérozoïte invasif (Persson *et al.*, 2008 ; Dvorin *et al.*, 2010 ; Gunalan *et al.*, 2011 ; Sahar *et al.*, 2011) et sont impliqués dans la formation de la jonction serrée entre le parasite et la membrane du globule rouge (Tham *et al.*, 2012). Pour leurs implications comme potentiels candidats vaccins, plusieurs études se penchent sur l'immunité et la diversité de la famille des protéines PfRh (Persson *et al.*, 2008 ; Tham *et al.*, 2012 ; Dent *et al.*, 2008 ; Ahouidi *et al.*, 2010 ; Reiling *et al.*, 2010 ; Taylor *et al.*, 2002 ; Bei *et al.*, 2007). Il existe cinq gènes *PfRh* fonctionnels: le *P. falciparum* réticulocyte Binding protein homolog 1 (*PfRh1*) (Rayner *et al.*, 2001 ; Gao *et al.*, 2008), *PfRh2a*, *PfRh2b* (Rayner *et al.*, 2000 ; Triglia *et al.*, 2001 ; Duraisingh *et al.*, 2003), *PfRh4* (Kaneko *et al.*, 2002 ; Stubbs *et al.*, 2005) et *PfRh5* (Hayton *et al.*, 2008 ; Baum *et al.*, 2009 ; Rodriguez *et al.*, 2008). *PfRh2a* et *PfRh2b*, sont des médiateurs importants de l'invasion parasitaire. Des études de knock-out de gènes ont montré que *PfRh2a* est impliqué dans une voie d'invasion indépendante de l'acide-sialique (Desimone *et al.*, 2009). *PfRh2b* intervient dans l'invasion en interagissant avec un récepteur érythrocytaire Z sensible à la chymotrypsine (Cowman *et al.*, 2006). Ces protéines induiraient des anticorps bloquant l'invasion et seraient de bons candidats pour le développement d'un vaccin en combinaison avec d'autres ligands (Reiling *et al.*, 2010 ; Triglia *et al.*, 2011). Cependant, ils diffèrent structurellement à l'extrémité c-terminal.

La région c-terminale du gène *PfRh2b* présente un grand polymorphisme structural (une délétion de 558 pb).

Cette délétion a été observée à des fréquences élevées chez des isolats de terrain de différentes régions d'Afrique et du monde (Jennings *et al.*, 2007 ; Lantos *et al.*, 2009 ; Ahouidi *et al.*, 2010).

En effet, la prévalence de cette délétion a été caractérisée pour la première fois en 2006 au Sénégal (Ahouidi *et al.*, 2010). Cependant la prévalence et l'évolution de la délétion en *PfRh2b* au cours du temps reste inconnues.

En outre, des études antérieures menées à Thiès, ont montré que les marqueurs SNP "Single Nucleotide Polymorphism" peuvent déterminer de manière sensible les changements temporels de la diversité génétique de *P. falciparum* (Daniels *et al.*, 2013). En effet, il existe une grande diversité à travers le génome, principalement au niveau des gènes exposés à la surface du parasite et des érythrocytes, y compris les ligands d'invasion. Ces ligands sont une cible des réponses immunitaires et demeure essentiel pour le développement d'un vaccin contre le stade sanguin (Richards *et al.*, 2009 ; Osier *et al.*, 2014). Par conséquent, la compréhension des changements temporels au niveau des fréquences des variantes alléliques chez les potentiels candidats vaccins est d'une importance majeure, car ces changements pourraient affecter l'efficacité du vaccin.

Ainsi, l'objectif général de cette étude était de caractériser l'évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie en fonction du temps.

Les objectifs spécifiques étaient :

- De déterminer la prévalence de la délétion en *PfRh2b* à Thiès (au Sénégal) de 2007 à 2013 et à Brikama (en Gambie) de 1984 à 2013 ;
- De déterminer la prévalence de la délétion en *PfRh2b* en fonction de l'âge dans chaque site ;
- D'estimer la différenciation temporelle du polymorphisme en *PfRh2b* à Thiès et à Brikama ;
- De voir s'il existe un lien entre le polymorphisme en *PfRh2b* et une empreinte génétique spécifique du parasite.

I. Matériel et méthodes

I.1. Sites d'étude et collecte des échantillons

Les échantillons de sang d'individus infectés par *P. falciparum*, ont été collectés lors des études antérieures menées à Thiès de 2007 à 2013 au SLAP et à Brikama de 1984 à 2013. A Thiès, le paludisme est hypo-endémique et sa transmission est assurée par *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis*. A Brikama, la transmission du paludisme est saisonnière et est assurée par *Anopheles arabiensis*, *An. gambiae* et *An. melas* (Betson *et al.*, 2009 ; Caputo *et al.*, 2008).

Au total, 1380 échantillons d'ADN ont été analysés (849 de Thiès et 531 de Brikama).

Ces études ont reçu l'approbation du comité d'éthique institutionnel de l'école de santé publique de Harvard, du Comité d'éthique du ministère de la santé du Sénégal et des Comités d'éthiques du gouvernement gambien et du MRC. Un consentement éclairé écrit a été obtenu directement des sujets adultes et des parents ou autres tuteurs légaux de tous les enfants participants.

I.2. Extraction d'ADN

L'ADN parasite a été extrait du sang total ou du papier filtre à l'aide de QIAmp DNA Mini (Qiagen, Valencia, ca, USA) suivant les instructions du fabricant.

I.3. Génotypage des allèles du gène *PfRh2b*

Nous avons utilisé la PCR semi-nichée pour amplifier le gène *PfRh2b*, selon la méthodologie décrite précédemment par Ahouidi *et al.*, (2010). Cette méthode consiste à une série consécutive de deux réactions de PCR qui utilise deux amorces sens différentes et une amorce anti-sens. L'ADN génomique de *P. falciparum*, obtenu après extraction, a été amplifié en utilisant le protocole décrit dans le tableau XVI.

Un contrôle positif (souche de laboratoire 3D7 de *P. falciparum*) et un contrôle négatif (eau bidistillée stérile) ont été inclus dans chaque réaction de PCR. Le produit d'amplification est révélé après migration électrophorétique sur gel d'agarose (1%) contenant 3 µl de bromure d'éthidium (BET) dans un tampon TBE à 1%. La taille des produits de PCR a été estimée en utilisant le marqueur d'échelle d'ADN le "Gene Ruler 100 pb" (Quick Load®, 100 pb DNA Ladder).

Tableau XIV : Programme et volume réactionnel de la première et deuxième amplification du gène *PfRh2b*

Première amplification du gène <i>PfRh2b</i>	
Séquence des amorces pour la 1^{ère} PCR	Programme de la 1^{ère} amplification
	1. 94°C 2 min
Amorce sens : PfRh2b DELF1 : 5'-TAA TGA TAT AAA GGA TCT TGG TGA-3'	2. 94°C 20 s
	3. 55°C 20 s
Amorce anti-sens : PfRh2b DELR : 5'-GTT ATG GTT TGA ATA CCT TTCA-3'	4. 60°C..... 2 min
	5. Retour à l'étape 2 et répéter 30 fois
	6. 70°C.....10 min
	7. 22°C infini
Volume réactionnel : H₂O : 11 µl ; Gotaq : 6 µl ; F1 : 1 µl ; R : 1 µl ; ADN (extrait à partir de sang total ou du papier filtre) : 1 µl	
Volume total = 20 µl	
Deuxième amplification du gène <i>PfRh2b</i>	
Séquence des amorces pour la 2^{ème} PCR	Programme de la 2^{ème} amplification
	1. 94°C 2 min
Amorce sens : PfRh2b DELF2 : 5'-GGA TAA AAT ACT AGA AAG TGA-3'	2. 94°C 20 s
	3. 55°C..... 20s
Amorce anti-sens : PfRh2b DELR : 5'-GTT ATG GTT TGA ATA CCT TTCA-3'	4. 60°C..... 2 min
	5. Retour à l'étape 2 et répéter 30 fois
	6. 70°C.....10 min
	7. 22°Cinfini
Volume réactionnel : H₂O : 10 µl ; Gotaq : 6 µl ; F2 : 1 µl ; R : 1 µl ; ADN (produit de la première amplification) : 2 µl	
Volume total = 20 µl	

I.4. Génotypage des SNP par la méthode "barcoding"

Parmi les échantillons de Thiès, 580 ont été précédemment génotypés à l'aide de la méthode "barcoding" par Daniels *et al.* (Daniels *et al.*, 2015). Ces échantillons ont été utilisés pour voir s'il existe une association entre le polymorphisme du gène *PfRh2b* et un code-barres spécifique du parasite.

I.5. Analyses Statistiques

Pour chaque année, pour inclure les isolats de génotype mixtes, la prévalence de chaque allèle de *PfRh2b* (*PfRh2b* délétion et *PfRh2b* full-length) a été calculée comme suit : (nombre d'isolats de l'allèle *PfRh2b* + (0.5 * nombre d'isolats mixtes)) / nombre total d'isolats (Ahouidi *et al.*, 2010).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATA, version 15. Nous avons utilisé le test chi 2 de tendances pour déterminer si les différences de fréquence au cours des années étaient statistiquement significatives. Les différences entre les groupes d'âge ont été évaluées à l'aide du test U de Mann-Whitney. L'indice de fixation de Wright (*Fst*) a été également calculé pour évaluer le degré de différenciation génétique du polymorphisme en *PfRh2b* à Thiès et à Brikama au fil du temps. Cette indice *Fst* a été utilisé par comme précédemment décrite (Drakeley *et al.*, 1996).

II. Résultats

II.1. Résultats de la PCR semi-nichée

Tous les échantillons utilisés ont été amplifiés et analysés avec succès pour le gène *PfRh2b*. Cette amplification nous a permis de détecter la présence de la délétion à 558 pb et du fragment entier ou "full-length" à 1111 pb (figure 16). Nous avons ensuite déterminé, pour chaque année, le nombre de parasites ayant la forme "full-length", la forme délétée et ayant les deux allèles à la fois (mixtes) (Tableau XV). L'analyse de ces résultats nous a permis de déterminer la prévalence de la délétion et de suivre son évolution au cours du temps (figure 17).

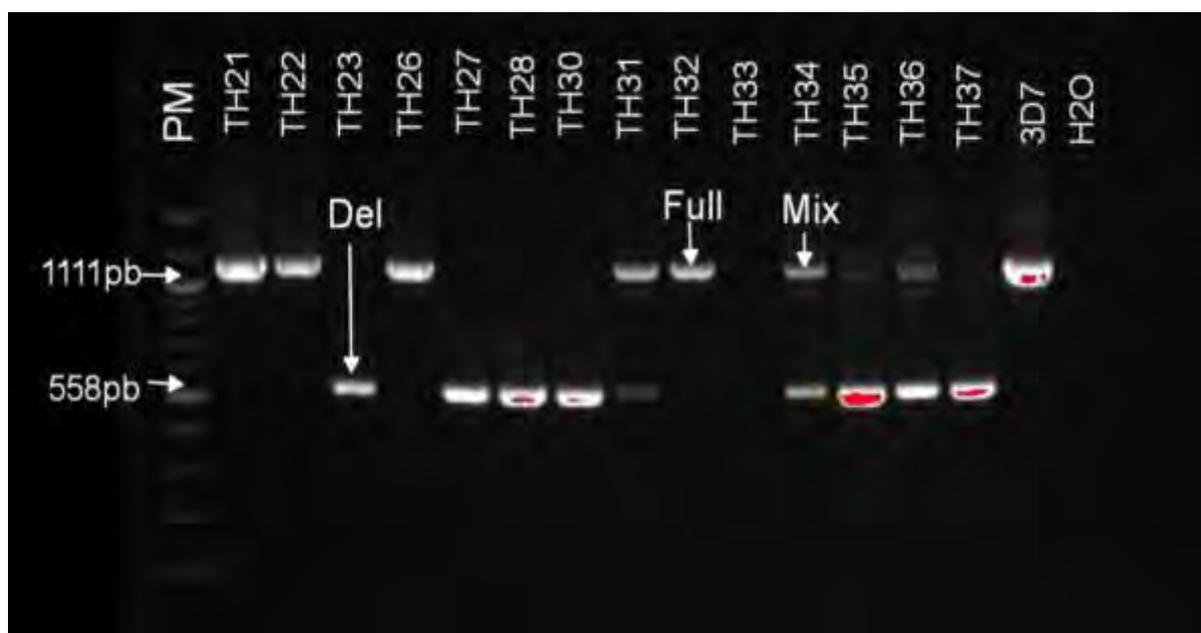


Figure 16 : Photographie du gel du produit de la deuxième amplification de quelques échantillons.

TH21 = isolats de Thiès, patient n° 21 ; Del = présence de la délétion ; full = séquence complète; Mix = délétion et séquence complète de *PfRh2b* ; PM = Poids moléculaire ; Pb= paire de bases

Tableau XV : Résultats du génotypage du gène *PfRh2b* à Thiès et à Brikama

Sites	Années	N	Allèles		
			<i>PfRh2bDel</i> (n)	<i>PfRh2bfull</i> (n)	Mix (n)
THIÈS	2007	127	78	36	13
	2008	118	75	39	4
	2009	102	58	41	3
	2010	114	41	67	6
	2011	121	43	74	4
	2012	141	57	75	9
	2013	126	43	73	10
Total		849			
BRIKAMA	1984	56	26	17	13
	2005	75	49	20	6
	2007	99	44	49	6
	2008	120	77	38	5
	2010	45	15	15	5
	2012	53	42	7	4
	2013	63	33	23	7
Total		531			

Colonne N montre le nombre d'échantillons analysés ; n = nombre d'échantillons pour chaque allèle ; *PfRh2bdel*= présence de la délétion ; *PfRh2bfull*= séquence complète ; Mix= présence des deux allèles (*PfRh2bdel* / *PfRh2bfull*)

II.2. Evolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* chez des isolats de terrain provenant de Thiès et de Brikama

La prévalence de la délétion a été déterminée en incluant les mixtes selon la formule décrite précédemment par Ahouidi *et al.* (Ahouidi *et al.*, 2010). A Thiès, la prévalence de la délétion a considérablement diminué, passant de 66,54% en 2007 à 38,1% en 2013 ($p < 0,0001$). Cette baisse n'était pas homogène avec la présence d'un pic en 2012, où la forme ayant la délétion en *PfRh2b* était présente dans 43,62% des infections (figure 17A).

Par contre, à Brikama, une variation temporelle de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* a été observée entre 1984 et 2013. Celle-ci a augmenté entre 1984 (58,04%) et 2005 (69,33%) ($p=0,03$), puis a diminué en 2007 (47,47%) ($p= 0,004$).

Entre 2007 et 2012, la prévalence de cette délétion a augmenté significativement, passant de 47,47% à 83,02% ($p= 0,00005$) et enfin elle a diminué significativement à 57,94% en 2013 ($p= 0,001$) (figure 17 B).

Comme les infections mixtes sont rares dans les populations endémiques, la fréquence des parasites avec et sans la délétion (mixtes) a été déterminée. Ainsi, à Thiès les infections mixtes étaient plus élevées en 2007 (0,10) et plus faible en 2009 (0,02). A Brikama, il y avait plus d'infections mixtes en 1984 (0,023) et moins de mixtes en 2008 (0,04) (Tableau XV).

Globalement, nous avons observé une diminution significative de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* de 2007 à 2013 à Thiès ($P < 0,0001$) et une fluctuation de celle-ci de 1984 à 2013 à Brikama.

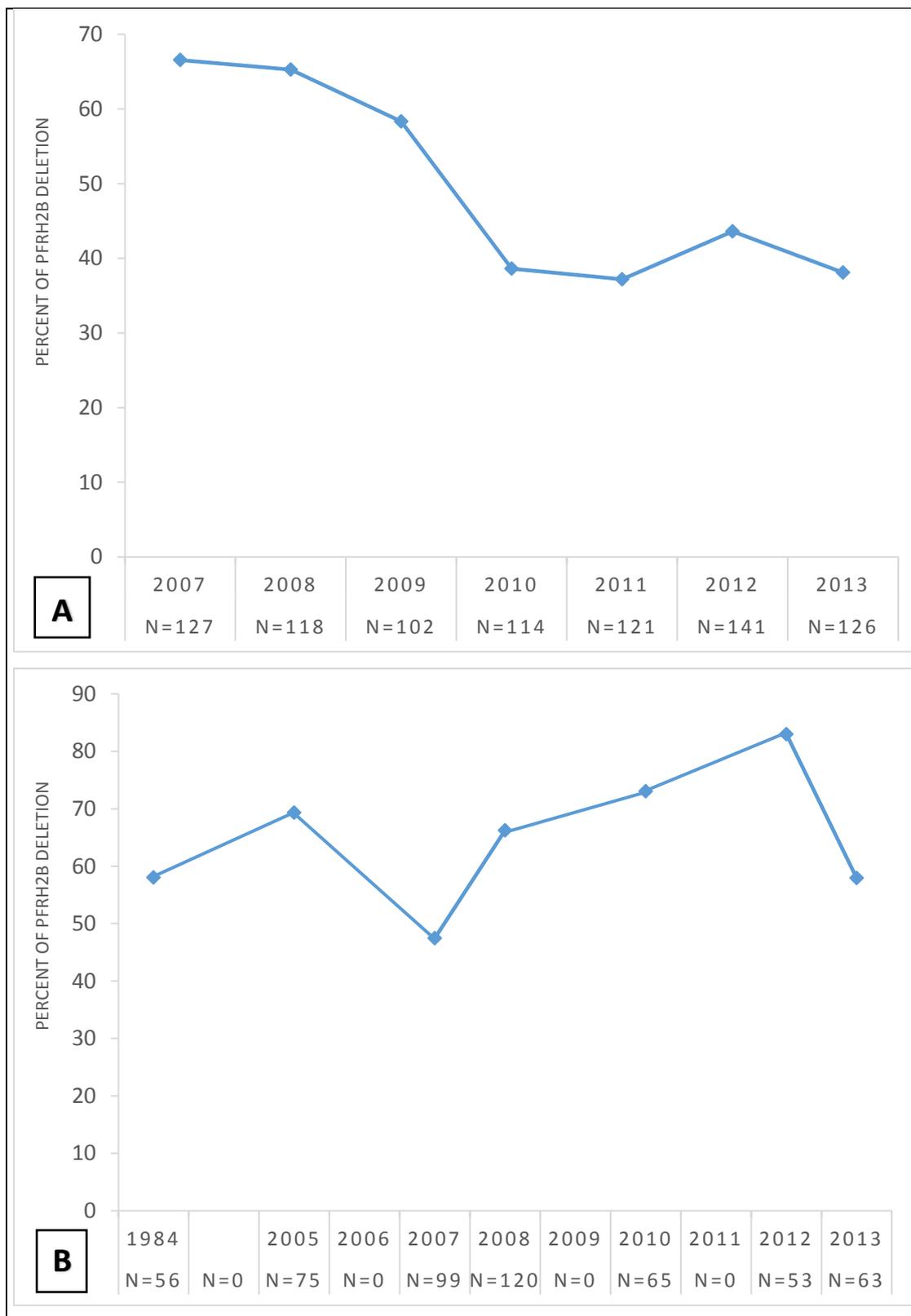


Figure 17 : Evolution de la délétion en *PfRh2b* à Thiès (A) et à Brikama (B)

Figure montrant la variation de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au cours du temps.

(A) Une diminution de la délétion en *PfRh2b* de 2007 à 2013 a été notée. (B) Une fluctuation de cette délétion en *PfRh2b* de 2007 à 2013 a été observée ; N = nombre d'isolats

II.3. Prévalence de la délétion en *PfRh2b* selon l'âge à Thiès et à Brikama

La présence de la délétion à haute fréquence dans la population générale et l'acquisition d'anticorps d'une manière dépendante de l'âge contre la région C-terminale de *PfRh2b* (Ahouidi *et al.*, 2010), ont soulevé l'intérêt de déterminer la prévalence de la délétion par groupe d'âge pour voir si la délétion serait plus fréquente chez les adultes puisqu'ils ont été plus exposés au paludisme.

Ainsi, parmi les 1380 isolats de *P. falciparum* testés, 934 (651 de Thiès et 283 de Brikama) ont été analysés pour déterminer la prévalence de cette délétion en fonction de l'âge. L'âge médian était utilisé pour diviser chaque population en deux groupes numériquement égaux.

À Thiès, étant donné que notre population d'étude était principalement composée d'adultes (62%), l'âge médian des 651 patients était de 18 ans. Ainsi, les parasites ayant la délétion en *PfRh2b* étaient moins fréquents chez les enfants par rapport aux adultes (figure 18A). À l'aide du test U de Mann-Whitney, nous avons observé une différence significative de la présence de cette délétion entre ces groupes d'âge ($p= 0,038$).

Par contre, À Brikama, l'étude portait sur des enfants (âgés de moins de 16 ans) ; l'âge médian des 283 patients était de 5 ans. La délétion en *PfRh2b* était plus fréquente chez les jeunes enfants comparés aux enfants plus âgés, mais la différence n'était pas significative par le test U de Mann-Whitney ($p= 0,316$) (figure 18B).

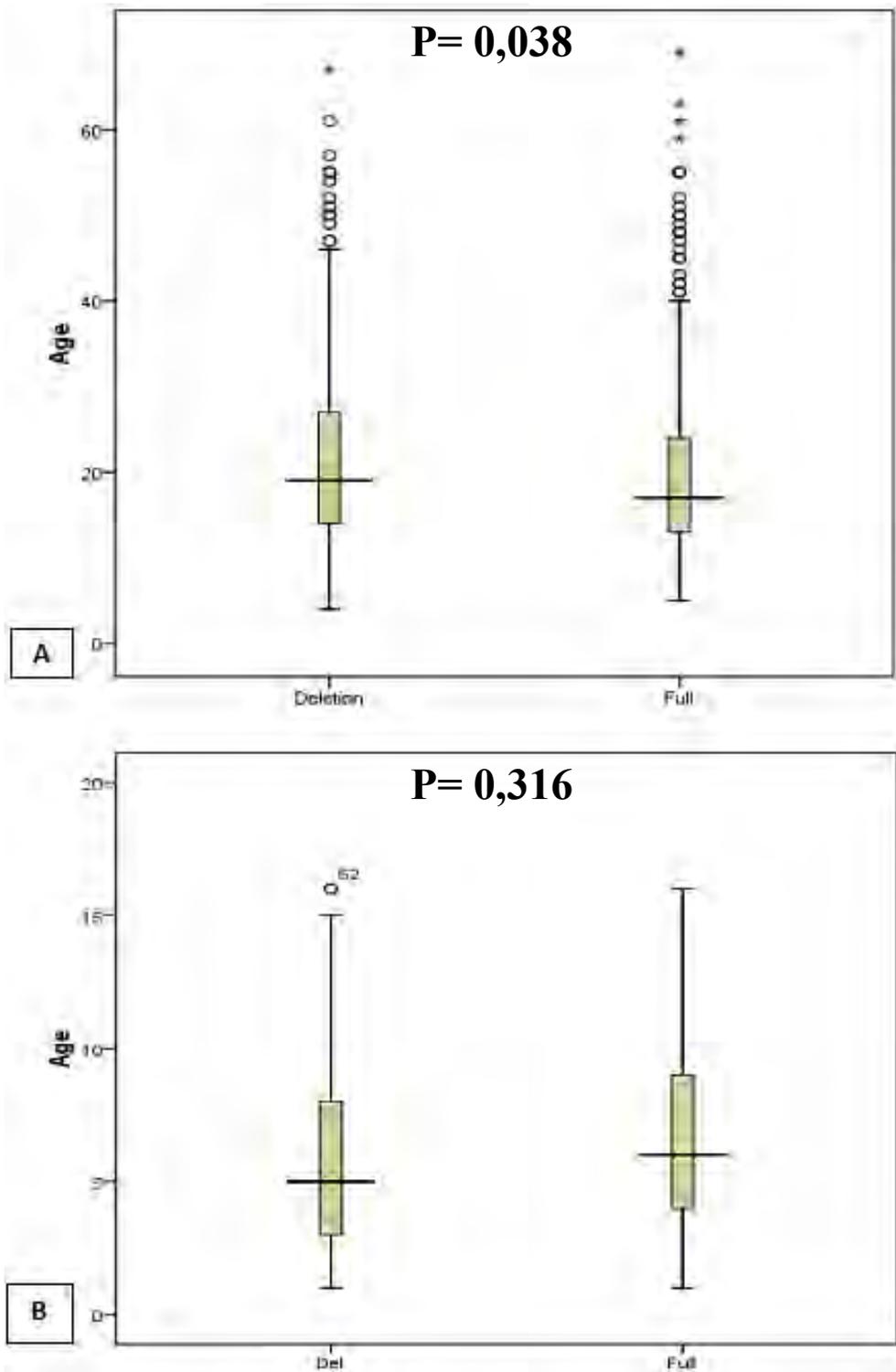


Figure 18 : Fréquence de la délétion en *PfRh2b* selon l'âge à Thiès (A) et à Brikama (B). Une variation de la présence de la délétion en *PfRh2b* en fonction de l'âge a été observée. A Thiès, une différence significative de la présence de cette délétion a été notée ($p = 0,038$). Par contre, à Brikama, nous n'avons pas noté de différence significative ($p = 0,316$).

p = valeur de p ; N = nombre d'isolats ; Del= isolats avec la délétion ; Full-length = isolats avec la séquence complète.

II.4. Différenciation temporelle du polymorphisme en *PfRh2b* chez des populations de parasites du Sénégal et de la Gambie

La diversité génétique chez des populations parasitaires est un réel obstacle à la validation d'un potentiel candidat vaccin. Dans cette étude, la différenciation génétique du gène *PfRh2b* à Thiès et à Brikama a été estimée en calculant l'indice de fixation de Wright (*Fst*) à partir des fréquences alléliques de ce locus en fonction des années.

Ainsi, à Thiès, la valeur de *Fst* obtenue de 2007 à 2013 était élevée (0,09). Par contre, la valeur *Fst* obtenue à Brikama de 1984 à 2013 était faible (0,057), ce qui suggère une différenciation génétique moindre de ces allèles dans cette zone au cours du temps (Tableau XVI).

Tableau XVI : Fréquences des allèles utilisées pour calculer *Fst* en fonction des années

Années	THIES			BRIKAMA		
	<i>PfRh2bdel</i>	<i>PfRh2bfull</i>	Diversité génétique h	<i>PfRh2bdel</i>	<i>PfRh2bfull</i>	Diversité génétique h
1984	-	-	-	0,58	0,42	0,487
2005	-	-	-	0,69	0,31	0,428
2007	0,67	0,33	0,442	0,47	0,53	0,498
2008	0,65	0,35	0,455	0,66	0,34	0,449
2009	0,58	0,42	0,487	-	-	-
2010	0,39	0,61	0,372	0,73	0,27	0,394
2011	0,37	0,63	0,466	-	-	-
2012	0,44	0,56	0,493	0,83	0,17	0,282
2013	0,38	0,62	0,471	0,58	0,42	0,487
Moyenne	0,497	0,503	0,455	0,648	0,351	0,432
	<i>Fst</i> = 0,09			<i>Fst</i> = 0,057		

PfRh2b~~del~~= isolats avec la délétion en *PfRh2b* ; *PfRh2b~~full~~*= isolats avec la séquence complète de *PfRh2b*.

II.5. Prévalence de la délétion de *PfRh2b* chez les isolats regroupés selon le code-barres moléculaire

Il a été observé à Thiès que le parasite ayant subi diverses pressions telles que les pressions médicamenteuse et immunitaire, s'est adapté en évoluant vers plus de parasites génétiquement identiques (Daniels *et al.*, 2012). Il est également supposé que le parasite ayant initialement la séquence complète de *PfRh2b*, s'est adapté en présentant la délétion suite aux différentes pressions. Pour tester l'hypothèse selon laquelle, le parasite ayant la délétion peut être lié à un code-barres spécifique, nous avons déterminé la prévalence de la délétion selon le code-barres.

Parmi les échantillons analysés pour le polymorphisme du gène *PfRh2b*, 580 de Thiès avaient été précédemment génotypés à l'aide du code-barres moléculaire de 24 SNP (Daniels *et al.*, 2015) et les résultats ont été classés en deux groupes : un groupe nommé "clusters", qui comprend les parasites ayant une similitude avec au moins un autre isolat dans leurs séquences nucléotidiques et un groupe appelé "uniques" regroupant des parasites avec un code-barres SNP unique. Ainsi, 41,73% (242/580) des échantillons appartenaient au groupe "clusters" et 58,27% (338/580) étaient dans le groupe "uniques" (Tableau XVII). Aucune différence significative de la fréquence de la délétion en *PfRh2b* entre le groupe des "clusters" et le groupe "uniques", n'a été trouvée ($p = 0,5014$).

Concernant les 338 isolats ayant des codes-barres uniques, 166 (49,11%) avaient la délétion et 172 (50,89%) avaient la séquence complète. Par conséquent, les deux allèles (*PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b~~full~~*) avaient une distribution similaire dans le groupe "uniques" (Tableau XVII).

En outre, les 242 isolats appartenant au groupe "clusters" ont été également analysés pour déterminer la fréquence des allèles du gène *PfRh2b*. Dans ce groupe, 62 sous-groupes distincts ont été identifiés, pour voir si les parasites ayant le même code-barres (c'est-à-dire la même séquence nucléotidique) présentaient la délétion ou la séquence complète du gène *PfRh2b*. Les résultats ont montré que 20 sous-groupes haplotypes "clusters" n'avaient que la délétion, 24 sous-groupes avaient la séquence complète et enfin 18 sous-groupes étaient des parasites ayant la délétion et la séquence complète (Tableau XVII).

Par ailleurs, l'analyse des résultats a montré que le nombre d'échantillons est différemment distribué dans chacun des 20 haplotypes clusters ayant uniquement la délétion en *PfRh2b*. Cette distribution variait également au cours du temps (Tableau XVIII).

En plus, l'évolution dans le temps des 20 haplotypes clusters contenant uniquement la délétion a montré une diminution de la prévalence de *PfRh2b~~del~~* de 2008 à 2010 et une légère augmentation entre 2010 et 2013 (figure 19).

Etant donné que certains haplotypes clusters ayant uniquement la délétion ont un nombre limité d'échantillons, les plus importants (c'est-à-dire les haplotypes "clusters" 4 et 16) ont été suivis au fil du temps (figure 20). Ainsi, l'haplotype "cluster" 4, a été trouvé en 2008 (n= 12) et en 2009 (n= 3), mais n'était pas présent les autres années. L'haplotype "cluster 16" n'était présent qu'en 2011 (n= 1) et 2012 (n= 6) (figure 21).

L'analyse de ces résultats au fil du temps suggère que la fréquence de la délétion en *PfRh2b* est liée à la présence de certains haplotypes "clusters" dans cette population.

Tableau XVII : Prévalences des allèles du gène *PfRh2b*, des haplotypes "clusters" et des codes-barres "uniques" chez les isolats de Thiès

Haplotype Clusters	Codes-barres Moléculaires	N (%)	N (isolats)	<i>PfRh2bdel</i>	<i>PfRh2b^{Full}</i>
Haplotype cluster 36	CACTGCAGACCGCACCCAAGCCTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 38	CACTCGAGATCGTCACCACGCTTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 45	TATTCCGGTCCGTCCCCTCGCTTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 51	TACTCCGGTTCGCACACACGACTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 49	TATTCGAAATCGCACCCCTAGATTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 48	TACTCCAGTCCATACACACGATTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 46	TACTGCAGATTGTACCCAAAAGCTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 57	CACTGCGGATTGTACCTAAGACTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 54	CGCTCCAGACTACACCCTAAAGCTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 53	TACTCCGGATTGTACCCAAGACTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 59	TACTCCGGTTTATACCTTAGACTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 61	TACCGGAGTCCGTACCTAAGCCTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 15	TACTCCGGTTCGTAAACTCGCCTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 63	TACTCCAGACCGCCCCTAAAATTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 9	TATTCCAGATXGCAACTTCGACTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 62	TACTCGAGACTGCNCATACACTTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 13	TACTCGAAACTXCCCATAAGCTTG	0,345	2	0%	100%

Haplotype Clusters	Codes-barres Moléculaires	N (%)	N (isolats)	<i>PfRh2b del</i>	<i>PfRh2b full</i>
Haplotype cluster 68	TACCCCGGACCACCAATAAGACTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 69	TACTGGGATCCGCACCTAAGACTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 67	CACTCCGGATTGCCACTTAGATTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 70	TATTCCGGACXACACACTAGCTTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 22	TACTCCGGATCGCACCTAGATTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 74	TACTCCAGACTATCCATTCGATTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 71	CACTCGGGATTXCCACTAAGCTTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 80	CATTCCAGTCCXCCAATAAGATTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 72	TATTGGGGATCGCAACCAAGATTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 77	TACTGGAGTCCGTACCTTAGCTTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 97	CACTCGAAATXATACCTTAGCTTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 87	TACTCGGGTCTATAAATAAGACTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 89	TACTCGAGTTTATACCTTAGACTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 92	TATTGCAGTCCXCAAATAAGCTTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 84	CACTCCAGTCCACCACNTAGATTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 96	TATTCCAGACCGCACATTAGCCTG	0,345	2	50%	50%
Haplotype cluster 93	TACTCCAGTCCGTCACTTAGACTG	0,345	2	100%	0%
Haplotype cluster 44	TACTCCAGACTACAACCTACGCCTG	0,345	2	0%	100%
Haplotype cluster 43	TATTCCAGATTGCAACTTCGCCTG	0,517	3	100%	0%
Haplotype cluster 58	CACTCGAGTTXACAACCTAGCCTG	0,517	3	33%	67%
Haplotype cluster 7	CACTCCGGATTGCCACTAAGATTG	0,517	3	33%	67%
Haplotype cluster 19	TATTCGAGTCTACACCTTCACTTG	0,517	3	100%	0%
Haplotype cluster 21	TACCCCGGTCCACCACTAAAATTG	0,517	3	0%	100%
Haplotype cluster 23	CACCCGAGTCCACCAACAAGACTG	0,517	3	0%	100%
Haplotype cluster 95	CACCCCGAATCXCACCTAAGACTG	0,517	3	0%	100%
Haplotype cluster 99	TACTCCGAACTGCACATTAGATTG	0,517	3	100%	0%
Haplotype cluster 55	TACTCCGGTTTGACACACGACTG	0,69	4	100%	0%
Haplotype cluster 64	TACTCGAGATXATACATACTTG	0,69	4	0%	100%
Haplotype cluster 10	CATTGCGATCTGCAACCTAAACTG	0,69	4	100%	0%
Haplotype cluster 24	CATTCCAGTCCXCCCATTAGATTG	0,69	4	25%	75%
Haplotype cluster 81	TACTCCAGATCGCACCCAAGCCTG	0,69	4	75%	25%

Haplotype Clusters	Codes-barres Moléculaires	N	N	<i>PfRh2b</i>	<i>PfRh2b</i>
		(%)	(isolats)	<i>del</i>	<i>full</i>
Haplotype cluster 98	CACTCGAGTTTACAACCTAAGATTG	0,69	4	25%	75%
Haplotype cluster 5	TACTCGAAACTGCCATAAGCTTG	0,69	4	0%	100%
Haplotype cluster 65	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	0,862	5	100%	0%
Haplotype cluster 8	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	0,862	5	100%	0%
Haplotype cluster 11	TACTCGAGATCATAACACTTG	0,862	5	0%	100%
Haplotype cluster 12	CACTGCGATCTGCAACCTAACTG	0,862	5	100%	0%
Haplotype cluster 6	CATTCCAGTCCGCCAATAAGATTG	1,034	6	0%	100%
Haplotype cluster 26	CACTCCAGTCCGTCACCAAGATTG	1,034	6	17%	83%
Haplotype cluster 17	TACCCCGGTCCACCAATAAGATTG	1,207	7	0%	100%
Haplotype cluster 16	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	1,207	7	100%	0%
Haplotype cluster 66	TGTTCCAGTTTATCACCACGCCTG	1,379	8	12,50%	87,50%
Haplotype cluster 18	TATTCCAGTCCACCCATAAGACTG	1,552	9	89%	11%
Haplotype cluster 4	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	2,586	15	100%	0%
Haplotype cluster 29	TACCCCGGTCCACCAATAAGACTG	7,241	42	9,50%	90,50%
	UNIQUES	58,27	338	49,11%	50,89%

La fréquence des allèles du gène *PfRh2b* (*PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b^{full}*) de chaque Haplotype "cluster" ainsi que celle des codes-barres "uniques" a été déterminée.

N = nombre d'isolats ; *PfRh2b~~del~~* = présence de délétion ; *PfRh2b^{full}* = séquence complète.

Tableau XVIII : fréquence de la délétion dans chaque "clusters" ayant uniquement la délétion au cours du temps

Haplotype	Samples ID	Molecular Barcodes	Samples ID	Del	Full
Haplotype cluster 65	Th 007.2010	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	Th 007.2010	1	0
	Th 015.2010	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	Th 015.2010	1	0
	Th 107.2010	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	Th 107.2010	1	0
	Th 123.2010	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	Th 123.2010	1	0
	Th 135.2010	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	Th 135.2010	1	0
Haplotype cluster 84	Th 125.2013	CACTCCAGTCCACCACNTAGATTG	Th 125.2013	1	0
	Th 127.2013	CACTCCAGTCCACCACNTAGATTG	Th 127.2013	1	0
Haplotype cluster 12	Th 007.2011	CACTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 007.2011	1	0
	Th 010.2011	CACTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 010.2011	1	0
	Th 061.2011	CACTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 061.2011	1	0
	Th 055.2012	CACTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 055.2012	1	0
	Th 222.2012	CACTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 222.2012	1	0
Haplotype cluster 10	Th 124.2010	CATTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 124.2010	1	0
	Th 027.2011	CATTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 027.2011	1	0
	Th 028.2011	CATTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 028.2011	1	0
	Th 116.2011	CATTGCGATCTGCAACCTAAACTG	Th 116.2011	1	0
Haplotype cluster 8	Th 038.2010	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	Th 038.2010	1	0
	Th 076.2010	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	Th 076.2010	1	0
	Th 179.2010	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	Th 179.2010	1	0
	Th 011.2011	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	Th 011.2011	1	0
	Th 073.2011	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	Th 073.2011	1	0
Haplotype cluster 16	Th 099.2011	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 099.2011	1	0
	Th 038.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 038.2012	1	0
	Th 043.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 043.2012	1	0
	Th 061.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 061.2012	1	0
	Th 098.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 098.2012	1	0
	Th 123.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 123.2012	1	0
	Th 160.2012	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	Th 160.2012	1	0
Haplotype cluster 48	Th 131.2008	TACTCCAGTCCATACACACGATTG	Th 131.2008	1	0
	Th 148.2008	TACTCCAGTCCATACACACGATTG	Th 148.2008	1	0
Haplotype cluster 93	Th 151.2013	TACTCCAGTCCGTCACCTTAGACTG	Th 151.2013	1	0
	Th 154.2013	TACTCCAGTCCGTCACCTTAGACTG	Th 154.2013	1	0
Haplotype cluster 99	Th 173.2013	TACTCCGAACTGCACATTAGATTG	Th 173.2013	1	0
	Th 191.2013	TACTCCGAACTGCACATTAGATTG	Th 191.2013	1	0
	Th 213.2013	TACTCCGAACTGCACATTAGATTG	Th 213.2013	1	0
Haplotype cluster 53	Th 145.2009	TACTCCGGATTGTCACCAAGACTG	Th 145.2009	1	0
	Th 150.2009	TACTCCGGATTGTCACCAAGACTG	Th 150.2009	1	0
Haplotype cluster 51	Th 042.2008	TACTCCGGTTCGCACACACGACTG	Th 042.2008	1	0
	Th 073.2008	TACTCCGGTTCGCACACACGACTG	Th 073.2008	1	0

Haplotype	Samples ID	Molecular Barcodes	Samples ID	Del	Full
Haplotype cluster 55	Th 044.2008	TACTCCGGTTTGCACACACGACTG	Th 044.2008	1	0
	Th 101.2008	TACTCCGGTTTGCACACACGACTG	Th 101.2008	1	0
	Th 105.2008	TACTCCGGTTTGCACACACGACTG	Th 105.2008	1	0
	Th 250.2008	TACTCCGGTTTGCACACACGACTG	Th 250.2008	1	0
Haplotype cluster 4	Th 004.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 004.2008	1	0
	Th 014.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 014.2008	1	0
	Th 036.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 036.2008	1	0
	Th 068.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 068.2008	1	0
	Th 088.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 088.2008	1	0
	Th 095.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 095.2008	1	0
	Th 112.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 112.2008	1	0
	Th 120.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 120.2008	1	0
	Th 173.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 173.2008	1	0
	Th 188.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 188.2008	1	0
	Th 214.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 214.2008	1	0
	Th 228.2008	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 228.2008	1	0
	Th 108.2009	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 108.2009	1	0
	Th 109.2009	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 109.2009	1	0
Th 153.2009	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	Th 153.2009	1	0	
Haplotype cluster 43	Th 143.2007	TATTCCAGATTGCAACTTCGCCTG	Th 143.2007	1	0
	Th 145.2007	TATTCCAGATTGCAACTTCGCCTG	Th 145.2007	1	0
	Th 155.2007	TATTCCAGATTGCAACTTCGCCTG	Th 155.2007	1	0
Haplotype cluster 9	Th 108.2010	TATTCCAGATXGCAACTTCGACTG	Th 108.2010	1	0
	Th 149.2010	TATTCCAGATXGCAACTTCGACTG	Th 149.2010	1	0
Haplotype cluster 45	Th 001.2008	TATTCCGGTCCGTCCCCTCGCTTG	Th 001.2008	1	0
	Th 003.2008	TATTCCGGTCCGTCCCCTCGCTTG	Th 003.2008	1	0
Haplotype cluster 49	Th 070.2008	TATTCGAAATCGCACCCCTAGATTG	Th 070.2008	1	0
	Th 090.2008	TATTCGAAATCGCACCCCTAGATTG	Th 090.2008	1	0
Haplotype cluster 72	Th 075.2012	TATTGGGGATCGCAACCAAGATTG	Th 075.2012	1	0
	Th 152.2012	TATTGGGGATCGCAACCAAGATTG	Th 152.2012	1	0
Haplotype cluster 36	Th 001.2007	CACTGCAGACCGCACCCAAGCCTG	Th 001.2007	1	0
	Th 011.2007	CACTGCAGACCGCACCCAAGCCTG	Th 011.2007	1	0
Haplotype cluster 19	Th 121.2011	TATTCGAGTCTACACCTTCACTTG	Th 121.2011	1	0
	Th 140.2011	TATTCGAGTCTACACCTTCACTTG	Th 140.2011	1	0
	Th 175.2012	TATTCGAGTCTACACCTTCACTTG	Th 175.2012	1	0

Dans chaque "cluster" la fréquence de la délétion varie au fil du temps

Th= Thiès ; Del= présence de la délétion ; Full= séquence complète

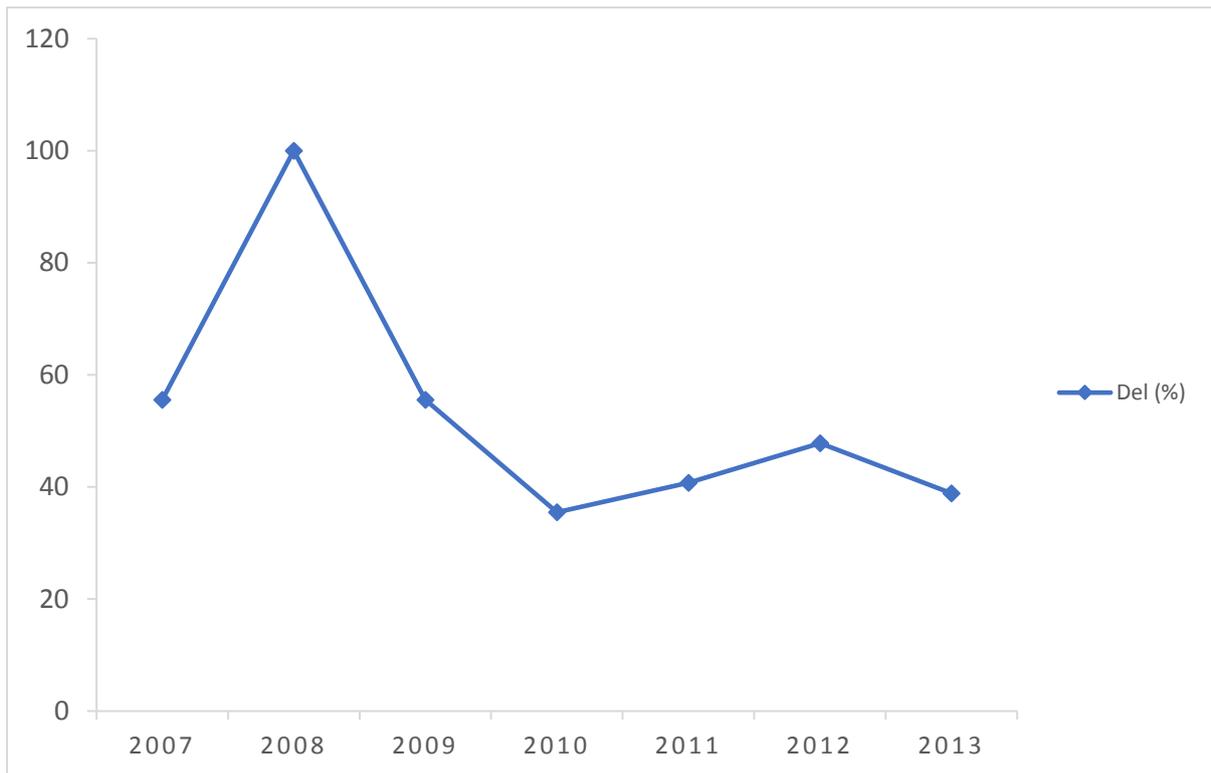
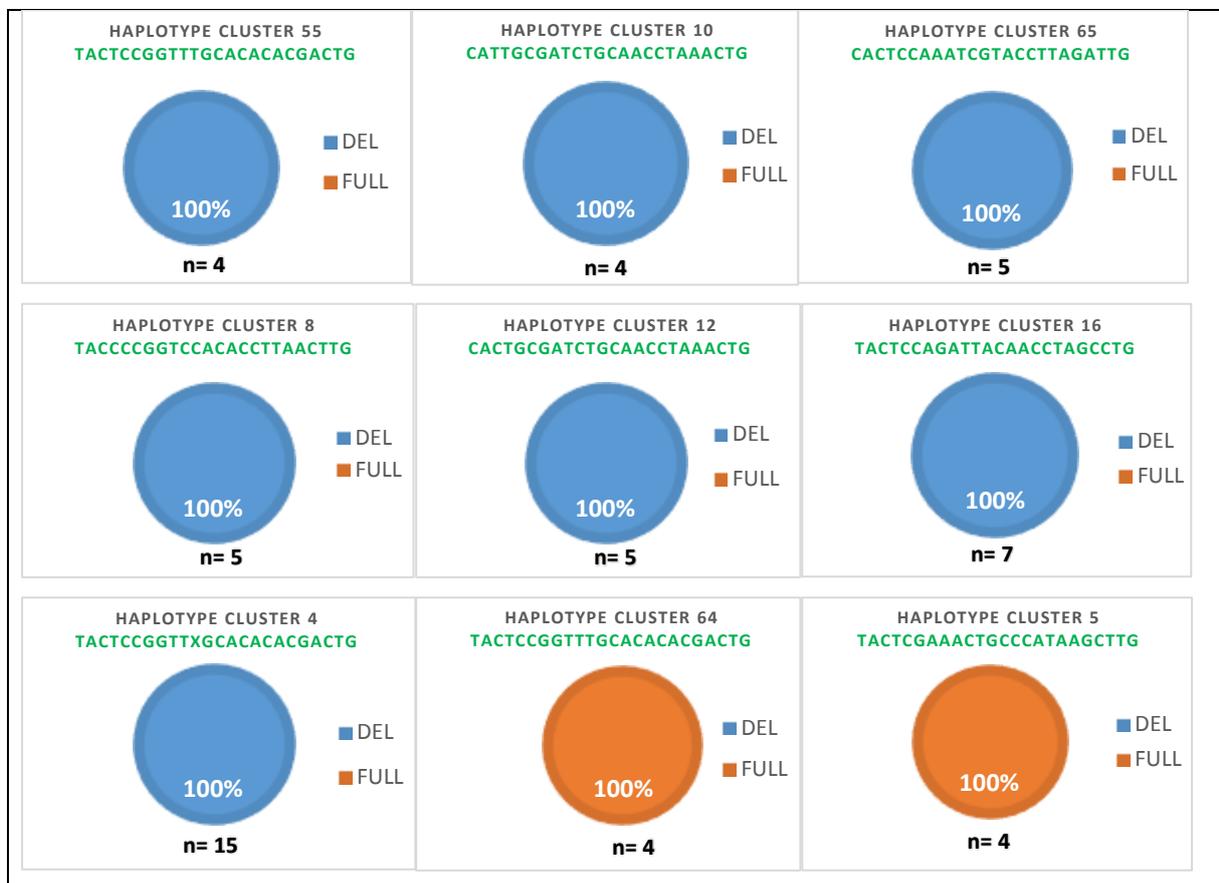


Figure 19 : Evolution dans le temps de *PfRh2bdel* chez les haplotypes "clusters" n'ayant que la délétion en *PfRh2b* à Thiès. *PfRh2bdel*= présence de la délétion en *PfRh2b*.



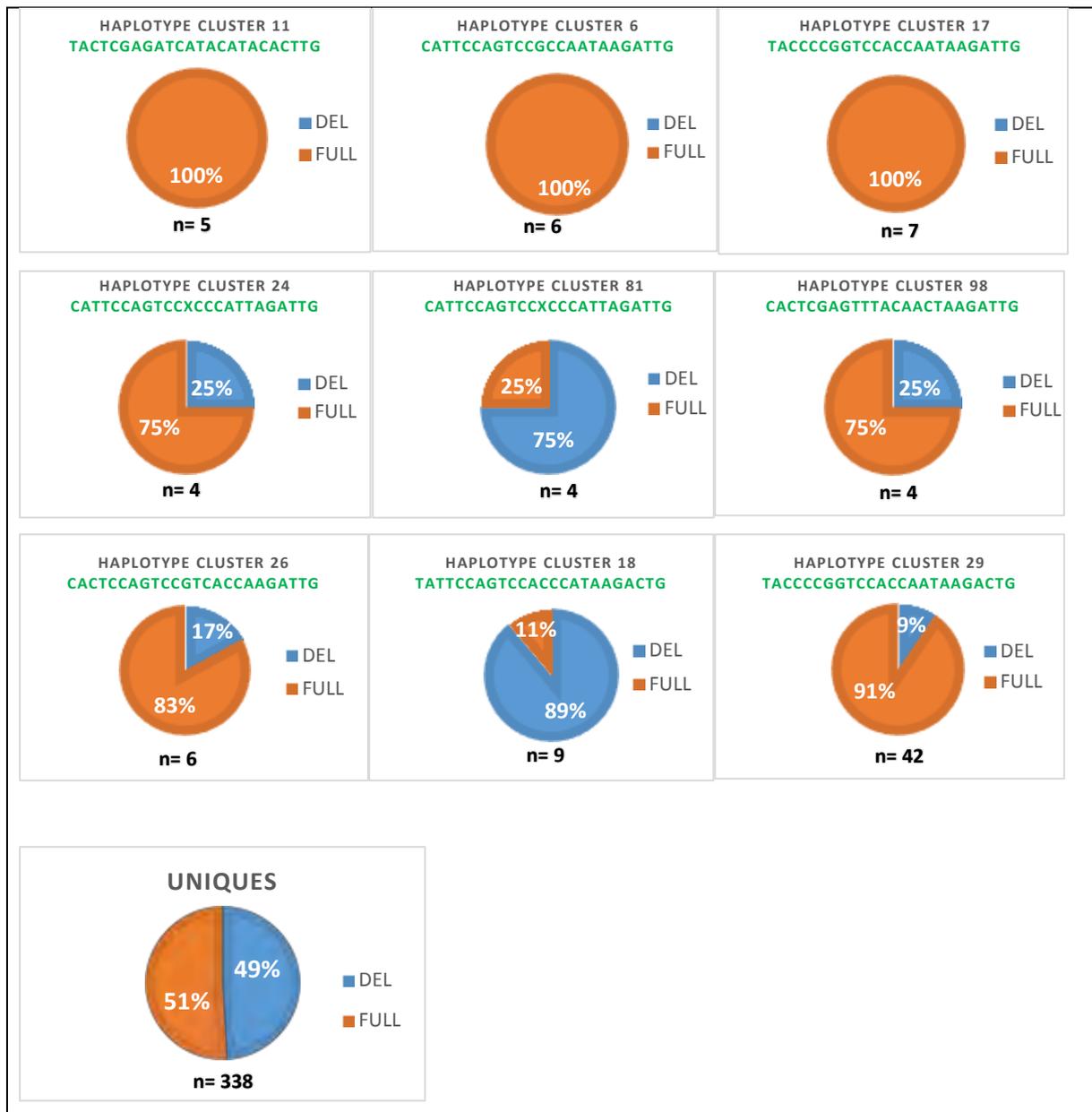


Figure 20 : Prévalence des allèles du gène *PfRh2b* (*PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b~~full~~*) dans certains sous-groupes haplotype "cluster" et dans le groupe "uniques" chez des isolats de Thiès.

Schéma de quelques sous-groupes haplotype "cluster" (à partir de n= 4) et du groupe "uniques" montrant les prévalences des allèles *PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b~~full~~*. Les graphiques en camembert de couleur bleu représentent des parasites ayant seulement la délétion. Ceux de couleur orange représentent les parasites n'ayant que la séquence complète du gène *PfRh2b*. Les parasites ayant les deux allèles *PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b~~full~~* sont représentés par les camemberts avec les deux couleurs. Le dernier camembert montre la fréquence de *PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b~~full~~* dans le groupe "uniques". n= nombre d'isolats dans chaque sous-groupe ; Del= présence de la délétion ; full= présence de la séquence complète.

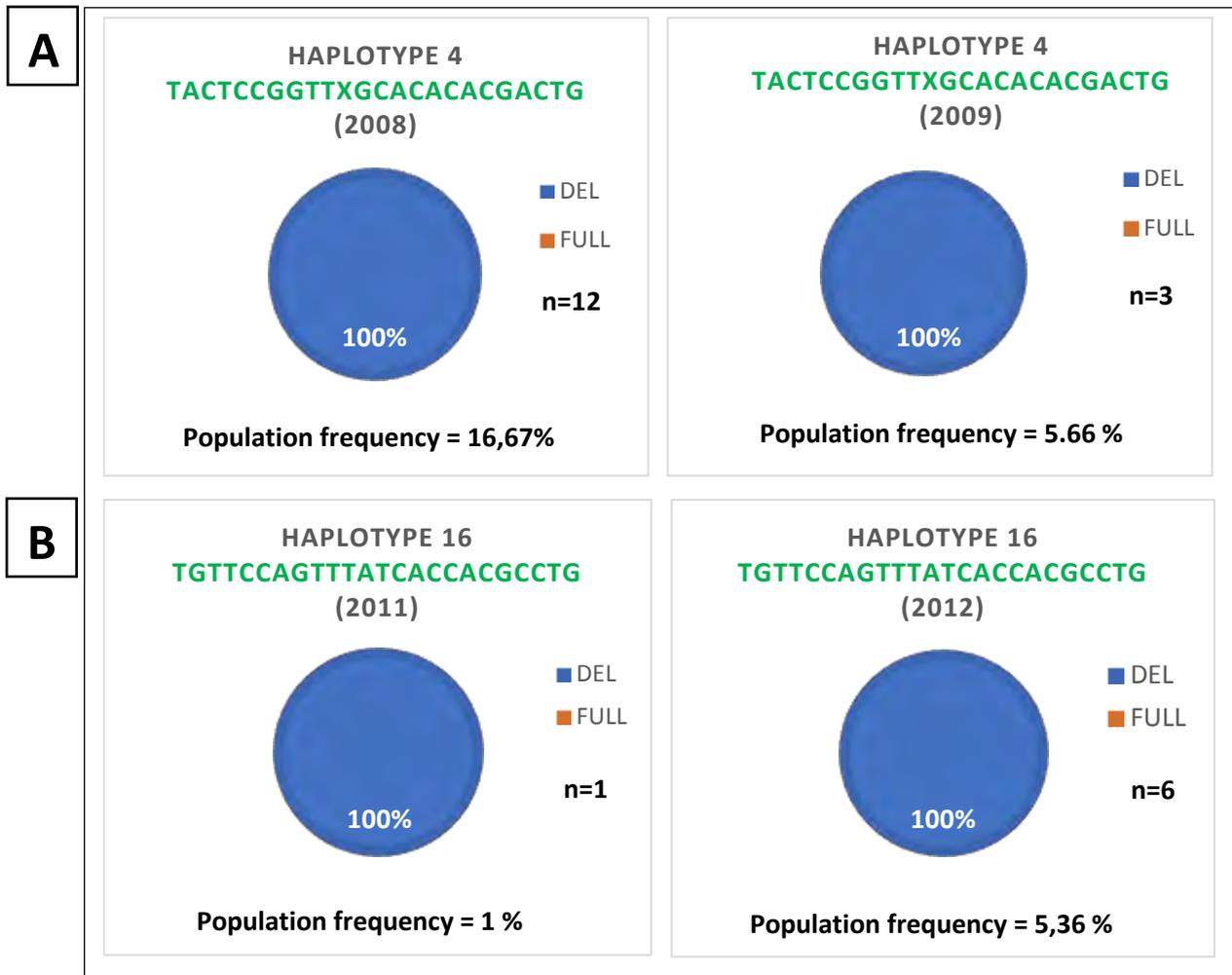


Figure 21 : Prévalence des allèles du gène *PfRh2b* (*PfRh2b~~del~~* et *PfRh2b^{full}*) par an au niveau des haplotypes "clusters" 4 et 16 et la fréquence de ces haplotypes dans la population d'étude.

(A) Prévalence de la délétion en *PfRh2b* dans le sous-groupe haplotype "cluster" 4 et la fréquence de cet haplotype dans la population d'étude en 2008 et 2009.

(B) Prévalence de la délétion en *PfRh2b* dans le sous-groupe haplotype "cluster" 16 et la fréquence de cet haplotype dans la population d'étude en 2011 et 2012.

Del= présence de la délétion ; Full = séquence complète ; n = nombre d'isolats

III. Discussion

Des travaux antérieurs ont montré que la délétion en *PfRh2b* était très répandue chez des isolats du Sénégal et de l'Afrique (Jennings *et al.*, 2007 ; Lantos *et al.*, 2009 ; Ahouidi *et al.*, 2010) et présente dans différentes régions du monde (Ahouidi *et al.*, 2010). Ce gène est une cible importante de l'immunité protectrice chez l'homme et pourrait être considéré comme un potentiel candidat pour le développement d'un vaccin au stade sanguin. Cependant, comme des types de parasites peuvent être sélectionnés, suite aux différentes stratégies de lutte ayant entraîné une diminution du paludisme dans les pays de l'Afrique sub-saharienne, les changements imposés à cette protéine PfRh2b demeurent inconnus.

L'objectif de cette étude était donc de suivre l'évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* en utilisant des échantillons provenant de Thiès de 2007 à 2013 et de Brikama de 1984 à 2013. Ainsi, la prévalence de cette délétion variait de 30 à 80% chez les deux populations. Cependant, si la prévalence de cette délétion a diminué au Sénégal, nous avons observé une fluctuation de celle-ci dans la population gambienne de 1984 à 2013.

Les différences de fréquences entre les deux pays et au sein de chaque pays peuvent être dues à : l'histoire génétique chez l'hôte humain, les modifications environnementales, la pression immunitaire, la pression médicamenteuse et ou la résistance aux antipaludiques (Daniels *et al.*, 2013 ; Le bras *et al.*, 2003).

Nous avons également déterminé la prévalence de la délétion en *PfRh2b* chez différents groupes d'âges. A Thiès, l'analyse des résultats a montré que la délétion était significativement plus présente chez les adultes comparés aux enfants. A Brikama, la prévalence de la délétion était plus fréquente chez les jeunes enfants par rapport aux enfants plus âgés, mais la différence n'était pas significative. Avec ces résultats observés, il est difficile de ressortir un lien entre l'âge et la présence de la délétion. D'autres études avec un nombre d'échantillons plus élevé, seraient importantes pour mieux étudier cette relation. Des résultats similaires ont été observés dans une étude antérieure (Ahouidi *et al.*, 2010).

Par ailleurs, le degré de différenciation génétique du polymorphisme en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie a été déterminé en utilisant *Fst* pour estimer la sélection de ce locus. En effet, l'intensité de la sélection peut conduire à des différences de diversité et générer des divergences entre les populations naturelles. Ainsi, la valeur de *Fst* trouvée à Thiès, de 2007 à 2013 était de 0,09. Cette valeur *Fst* était plus élevée que celle observée pour le gène *PfRh2b* et d'autres gènes comme *msp2*, *EBA175* et *Pfs48/45* entre les sites du Sénégal et entre les pays africains.

Cependant, cette valeur *Fst* était inférieure à celle observée pour *PfRh2b*, *msp2* et *Pfs48/45*, mais supérieure à la valeur *Fst* du gène *EBA175*, en combinant l'Afrique et l'Asie du sud-Est (Ahouidi *et al.*, 2010).

Par contre, si on combine tous les sites de l'étude d'Ahouidi *et al.* (2010) à savoir Afrique, Asie du Sud-Est et Brésil, nous constatons que la valeur *Fst* trouvée dans notre étude était inférieure à celle observée pour les gènes *PfRh2b*, *msp2*, *EBA175* et *Pfs48/45*. D'après ces résultats nous pouvons en déduire que *PfRh2b* avait une faible différenciation génétique à Thiès au cours du temps.

A Brikama, la valeur de *Fst* trouvée de 1984 à 2013, était de 0,057. Cette valeur *Fst*, inférieure à celle que nous avons trouvée à Thiès, indique que *PfRh2b* présentait également une faible différenciation à Brikama.

D'une manière générale, les valeurs de *Fst* obtenues dans cette étude indiquent qu'il existe peu de différence génétique entre les allèles au cours du temps, suggérant que le polymorphisme en *PfRh2b* est sous sélection équilibrée à Thiès et à Brikama.

En outre, la prévalence de la délétion selon le code-barres moléculaire des isolats de Thiès a été analysée pour voir s'il existe une association entre la délétion et un code-barres spécifique dans cette région. L'analyse de la distribution du polymorphisme chez les codes-barres identiques, suggère que la délétion est liée à certains haplotypes "clusters" dans la population.

Nos résultats fournissent des informations sur la diversité génétique du gène *PfRh2b* qui pourraient être utiles pour la validation de cet antigène comme potentiel candidat vaccin.

Conclusion

Les tendances temporelles de la fréquence de la délétion en *PfRh2b* diffèrent au Sénégal et en Gambie. Cela peut suggérer que certains facteurs pourraient influencer sur la prévalence de la délétion au fil des années. Les changements de la fréquence du polymorphisme en *PfRh2b* au cours du temps pourraient être un obstacle à la mise en œuvre de cette protéine comme potentiel candidat vaccin car ces variations peuvent affecter son efficacité. Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de lien entre la délétion en *PfRh2b* et un code-barres spécifique du parasite.

Il serait important d'étudier les réponses anticorps acquises naturellement contre *PfRh2b* au cours du temps, dans plusieurs pays avec différents niveaux d'endémicité palustre pour voir s'il existe une variation des réponses immunitaires selon la population.

CHAPITRE 2 : DISCUSSION GENERALE

Le présent travail a évalué les marqueurs moléculaires de la résistance (*Pfdhfr* et *Pfdhps*) associés à la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) ainsi que le polymorphisme du gène *PfRh2b* impliqué dans le processus de pénétration du mérozoïte de *P. falciparum* dans l'érythrocyte.

Cette thèse avait comme objectifs spécifiques :

- De comparer les résultats du génotypage du gène *Pfdhfr* par la PCR-RFLP et par la HRM, afin d'utiliser la technique la plus sensible pour déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et en Tanzanie ;
- D'évaluer la possibilité de l'extraction de l'ADN à partir des TDR et déterminer les mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et aux Comores ;
- De caractériser l'évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie en fonction du temps.

Nous avons d'abord comparé les résultats du génotypage du gène *Pfdhfr* par la PCR-RFLP et par la HRM en utilisant des échantillons provenant des localités ayant des niveaux d'endémicités différents : Thiès et Mlandizi. En effet, l'utilisation d'échantillons provenant de ces différentes zones, permettait de mieux apprécier la sensibilité et la spécificité de ces techniques dans la caractérisation des infections palustres. Des études antérieures ont décrit l'existence de différentes méthodes pour évaluer l'association des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) et des phénotypes spécifiques (O'Meara *et al.*, 2001 ; Duraisingh *et al.*, 2003 ; Gan *et al.*, 2010 ; Daniels *et al.*, 2012). Dans la présente étude, nous avons montré que la technique HRM est plus sensible que la PCR-RFLP dans la détection des infections mixtes et permet également de détecter de nouvelles mutations qui pourraient augmenter le niveau de résistance. En outre, la HRM est simple d'utilisation, ce qui la rend pratique pour des études de terrain. Les performances de cette technique ont été aussi révélées par des études antérieures (Reed *et al.*, 2004 ; 2007 ; Andriantsoanirina *et al.*, 2009 ; Gan *et al.*, 2010 ; Cruz *et al.*, 2010 ; Daniels *et al.*, 2012). Ainsi, la technique HRM étant considérée comme la plus sensible, elle a été utilisée pour l'étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP à Thiès et à Mlandizi. En outre, la HRM a été également utilisée pour l'étude de la résistance de *P. falciparum* à partir de l'ADN extrait des TDR collectés à Thiès et en Grande Comore. En effet, les TDR utilisés pour le diagnostic des cas suspects de paludisme, sont des ressources précieuses pour la génomique, comme il a été démontré par des études antérieures (Veron *et al.*, 2006 ; Cnops *et al.*, 2011 ; Ishengoma *et al.*, 2011 ; Morris *et al.*, 2013).

Dans notre étude, nous avons confirmé qu'il est possible d'extraire de l'ADN à partir des TDR en déterminant, par HRM, la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* associés à la résistance de *P. falciparum* à la SP. Ainsi, si nous comparons nos résultats trouvés à Thiès avec ceux de l'étude de Daniels *et al.*, (Daniels *et al.*, 2012) menée à Thiès, avec la même technique (HRM), mais à partir de l'ADN extrait du sang fixé sur papier filtre, nous constatons que les résultats sont similaires. Ces résultats indiquent que l'ADN extrait des TDR peut être utilisé pour des études moléculaires. En plus, l'utilisation des TDR comme matériel biologique, pourrait éviter des prélèvement de sang veineux ou d'échantillons de sang sur papier filtre.

Dans cette présente thèse, nous avons également déterminé, par la HRM, la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* pour mieux définir l'épidémiologie des parasites résistants à la SP. En effet, avec l'apparition et la propagation des parasites résistants à la SP dans divers pays du monde, une surveillance systématique des mutations des gènes affectant l'efficacité de cette molécule, par des méthodes robustes et sensibles, est essentielle. Cette étude permettait de voir si cette combinaison pourrait continuer à être utilisée pour le TPI chez les femmes enceintes et les enfants dans nos sites d'études. Ainsi, nous avons trouvé des prévalences élevées de mutations au niveau des codons N51I, C59R et S108N du gène *Pfdhfr* et au niveau du codon A437G du gène *Pfdhps* dans nos différentes études. Des études antérieures ont aussi trouvé des résultats similaires (Wurtz *et al.*, 2012 ; Baraka *et al.*, 2015). Ces prévalences élevées de mutations pourraient être dues à l'utilisation de la SP comme traitement du paludisme simple et du TPI chez les femmes enceintes et les enfants. En outre, nous avons observé que ces prévalences étaient plus élevées au Sénégal qu'en Tanzanie. De même, nous avons observé que les résultats obtenus à Thiès étaient plus élevés que ceux obtenus par Daniels *et al.* (Daniels *et al.*, 2012) au niveau des codons N51I (85% en 2007 par rapport à 94% en 2011), C59R (85% en 2007 comparativement à 92% en 2011) et S108N (93% en 2007 par rapport à 98% en 2011) du gène *Pfdhfr* et du codon A437G (48% en 2007 par rapport à 56% en 2011) du gène *Pfdhps* dans cette région. Nous avons également constaté que nos résultats obtenus à Thiès étaient plus élevés que ceux trouvés par Ndiaye *et al.* (Ndiaye *et al.*, 2005) à Thiès, au niveau des codons N51I (40%), C59R (40%) et S108N (67%) du gène *Pfdhfr*. De même, nos résultats étaient plus élevés que ceux trouvées à Pikine au niveau des codons N51I (65%), C59R (61%) et S108N (78%) du gène *Pfdhfr* et au niveau du codons A437G (40%) du gène *Pfdhps* par Ndiaye *et al.* (Ndiaye *et al.*, 2005).

En outre, si nous comparons nos résultats des Comores avec ceux obtenus par Rebaudet *et al.* (Rebaudet *et al.*, 2010) dans cette zone, nous constatons que le nombre de mutations était significativement plus élevé dans notre étude, en particulier au niveau du codon N51I (38,5% en 2007 comparativement à 62,5% en 2012-2013 ; $p = 0,02$), au niveau du codon S108N du gène *Pfdhfr* (50% en 2007 par rapport à 93% en 2012-2013 ; $p < 0,05$) et au niveau du codon A437G du gène *Pfdhps* (4% en 2007 par rapport à 29,8% en 2012-2013 ; $p = 0,006$). De même, nos résultats obtenus à Mlandizi étaient plus élevés que ceux de Kidima *et al.* (Kidima *et al.*, 2006) dans ce site, au niveau des codons N51I (60%), C59R (38%) et S108N (72%) du gène *Pfdhfr* et au niveau du codon A437G (18%) du gène *Pfdhps*. Cette augmentation de prévalences des mutations observée au niveau de ces gènes au fil du temps peut être due à l'utilisation continue de la SP ou de tout autre dérivé de la SP dans ces régions. Toutefois, nous n'avons pas trouvé la mutation K540E du gène *Pfdhps* dans nos différentes études. Cependant, la mutation K540E a été trouvée à des prévalences faibles en Afrique occidentale et centrale. Celles-ci étaient, de 0,3% au Cameroun entre 2004 et 2006 (Mbacham *et al.*, 2010), 0,8% au Congo en 2004 (Pearce *et al.*, 2009), 5,2% en république centrafricaine en 2004 (Ménards *et al.*, 2006), 6,25% au Gabon en 2007 (Pearce *et al.*, 2009), 11% à Sao Tomé et aux îles Principe en 2004 (Salgueiro *et al.*, 2010) et 24% au Nigéria en 2004 (Happi *et al.*, 2005). Ainsi, la vigilance est nécessaire puisque l'OMS recommande de remplacer la SP, si la prévalence de la mutation K540E dépasse 50% (OMS, 2009 ; OMS, 2010).

Par ailleurs, la quintuple mutation (*Pfdhfr* N51I/C59R/S108N + *Pfdhps* A437G/K540E), qui est un facteur prédictif important de l'échec thérapeutique de la SP (Bwijo *et al.*, 2003 ; Roper *et al.*, 2003 ; Talisuna *et al.*, 2004 ; McCollum *et al.*, 2012) n'a pas été observée dans nos différentes études. Par conséquent, la SP peut continuer à être utilisée pour le TPIg comme il a été recommandé par l'OMS (OMS, 2009).

Comme la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques reste toujours un problème de santé public, un vaccin efficace est nécessaire pour éliminer le paludisme. Ainsi, plusieurs antigènes candidats vaccins sont en développement (Méchain *et al.*, 2015). Ces candidats vaccins se distinguent pour les stades parasitaires auxquels les antigènes sont exprimés. Parmi les antigènes du *P. falciparum* exprimés au stade sanguin, nous avons la famille des protéine PfRh qui intervient dans la formation de la jonction serrée entre le mérozoïte et l'érythrocyte. Dans cette famille, nous avons la protéine PfRh2b qui est une cible importante des réponses immunitaires et pourrait être considérée comme un potentiel candidat vaccin.

Des études antérieures ont montré que cette protéine présentait une délétion à des fréquences élevées dans différentes régions d’Afrique et du monde (Jennings *et al.*, 2007 ; Lantos *et al.*, 2009 ; Ahouidi *et al.*, 2010). Il est donc essentiel de suivre l’évolution de cette délétion au cours du temps, car les changements temporels des fréquences alléliques de cet antigène pourraient affecter l’efficacité du vaccin. Dans la présente thèse, nous avons caractérisé l’évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie en fonction du temps.

Ainsi, nous avons montré que la prévalence allélique du gène *PfRh2b* variait d’une année à l’autre mais également en fonction des localités. Ces données suggèrent que certains facteurs, pourraient influencer sur la prévalence de la délétion au fil du temps.

Nous avons aussi observé que cette délétion variait selon les tranches d’âge à Thiès et à Brikama. Cependant, ces résultats ne permettent pas de ressortir un lien entre l’âge et la présence de cette délétion. Une étude antérieure a aussi trouvé des résultats similaires (Ahouidi *et al.*, 2010).

Par ailleurs, nous avons montré, par des analyses génétiques, qu’il y a peu de différenciation génétique de *PfRh2b* parmi les populations de parasites du Sénégal et de la Gambie, suggérant que ce gène est sous sélection équilibrée dans ces sites. Ces données suggèrent que l’utilisation des analyses génétiques pour prédire des gènes qui sont sous sélection équilibrée ou directionnelle est une bonne approche qui permet d’identifier les bons candidats vaccins. Une étude antérieure a suggéré qu’un bon candidat vaccin doit incorporer une région de protéine qui contient très peu de formes alléliques et présente une forte sélection équilibrée (Conway *et al.*, 1997).

Nos résultats fournissent des données importantes sur le niveau de résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et sur la diversité génétique du gène *PfRh2b* qui pourrait être utiles pour la mise en place de nouveaux médicaments contre le paludisme et/ou d’un vaccin qui empêcherait la pénétration du mérozoites dans le globule rouge humain.

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'une part de contribuer à la connaissance du niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP dans des pays ayant des niveaux d'endémicité différents ; et d'autre part de fournir des données utiles pour la validation du gène *PfRh2b* comme potentiel candidat vaccin. Ces résultats ont des implications importantes en termes de lutte contre le paludisme.

En effet, un meilleur dépistage des infections palustres permettrait d'éviter le développement des résistances et la dispersion des gènes qui y sont associés. Ainsi, nos résultats ont montré que la technique HRM est un outil sensible qui permet de mieux apprécier la prévalence des infections mixtes et de trouver de nouvelles mutations susceptibles d'augmenter le niveau de la résistance aux antipaludiques. Nous recommandons l'utilisation de cette technique pour mieux définir l'épidémiologie des parasites résistants aux antipaludiques.

En outre, nous avons trouvé par HRM, des prévalences élevées de mutations au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr* et au niveau du codon 437 du gène *Pfdhps* dans deux sites ayant des niveaux d'endémicité différents : Thiès (Sénégal) et Mlandizi (Tanzanie). Toutefois, ces prévalences étaient plus élevées au Sénégal qu'en Tanzanie. Cependant, la mutation 540E ainsi que la quintuple mutation *Pfdhfr* 51I / 59R / 108N + *Pfdhps* 437G / 540E, fortement associée à l'échec clinique de la SP n'ont pas été observées dans cette étude. Par conséquent, la SP peut toujours être utilisée pour le Traitement Préventif Intermittent chez les femmes enceintes et chez les enfants comme le recommande l'OMS. Par ailleurs, avec l'apparition et la diffusion des parasites résistants à la SP dans divers pays du monde, une surveillance régulière du niveau de résistance de *P. falciparum* à cette molécule devient une priorité surtout dans les pays où la SP est utilisée pour le TPI chez les femmes enceintes et chez les enfants. Comme la quintuple mutation a récemment été observée dans un échantillon au Sénégal, nous recommandons une sensibilisation des populations sur les conséquences de l'automédication et l'utilisation abusive de la SP pour limiter les risques d'émergence de la résistance à cette molécule. Il serait important d'évaluer dans le futur, l'efficacité de la SP pour le TPI en se focalisant sur les femmes enceintes et les enfants dans des pays ayant des niveaux d'endémicité différents.

Nous avons aussi confirmé que l'ADN peut être extrait des TDR et être utilisé pour des études de biologie moléculaire. Les TDR peuvent être une alternative lorsqu'il est difficile d'obtenir des échantillons de sang séché sur des papiers filtres ou du sang veineux. L'utilisation des TDR comme source d'ADN permet d'éviter des prélèvements multiples chez le patient.

En effet, pour évaluer la possibilité de l'extraction de l'ADN à partir des TDR, nous avons utilisé la technique HRM pour déterminer la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* au Sénégal et aux Comores. Ainsi, des prévalences élevées de mutations ont été trouvées au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *Pfdhfr* et au niveau du codon 437 du gène *Pfdhps*. Les TDR étant l'une des méthodes les plus utilisées pour diagnostiquer le paludisme, nous avons conclu que ces TDR peuvent servir de source d'extraction de l'ADN de *P. falciparum* pour les études de terrain et éviter de faire des prélèvements veineux qui peuvent être contraignants pour le patient mais aussi pour le laboratoire.

Par ailleurs, avec la hausse de la résistance de *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques, un vaccin efficace constitue un outil puissant dans la lutte contre ce fléau. Différentes approches vaccinales ciblent le parasite à différentes étapes de son cycle biologique en fonction des antigènes. Nous avons travaillé sur le stade sanguin qui est responsable des signes cliniques et par conséquent de la morbidité et de la mortalité liée au paludisme. A ce stade le parasite exprime des antigènes qui sont aussi exposés au système immunitaire. De ce fait ces antigènes peuvent être le siège d'une diversité génétique et exprimer une variation antigénique importante. Parmi ces antigènes, nous avons la famille des protéines PfRh qui joue un rôle important dans le processus de pénétration du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* dans le globule rouge humain. Dans cette famille, nous nous sommes focalisés sur la protéine PfRh2b qui présente une délétion dans sa région c-terminal. En plus, cette délétion était présente à des fréquences variables chez des souches provenant de différents pays du monde (Ahouidi *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons trouvé une diminution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* de 2007 à 2013 à Thiès et une fluctuation de celle-ci de 1984 à 2013 à Brikama.

Par ailleurs, nos résultats ont montré une faible différenciation génétique de *PfRh2b*, suggérant que ce gène est sous sélection équilibrée à Thiès et à Brikama. D'une manière générale cette étude a fourni des informations importantes sur la diversité génétique du gène *PfRh2b* qui seront utiles dans la validation de cet antigène comme potentiel candidat vaccin. Il serait important, dans le futur, d'étudier les réponses anticorps acquises naturellement contre *PfRh2b* au cours du temps, dans plusieurs pays avec différents niveaux d'endémicité palustre.

Face à l'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques, la mise au point de nouveaux médicaments et/ou d'un vaccin efficace reste essentielle pour l'élimination du paludisme.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abkarian, M., Massiera, G., Berry, L., Roques, M., Braun-Breton, C. (2011). A novel mechanism for egress of malarial parasites from red blood cells. *Blood*, 117(15), 4118–24.
2. Adams, J. H., Blair, P. L., Kaneko, O., Peterson, D. S. (2001). An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 17(6), 297-9.
3. Ahouidi, A. D, Bei, A. K., Neafsey, D. E., Sarr, O., Volkman, S., Milner, D., Cox-Singh, J., Ferreira, M. U., Ndir, O., Premji, Z., Mboup, S., Duraisingh, M. T. (2010). Population genetic analysis of large sequence polymorphisms in *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. *Infect Genet Evol*, 10(2), 200-06.
4. Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J., Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol*, 77(1), 72-82.
5. Amodu, O. K., Oyediji, S. I., Ntoumi, F., Orimadegun, A. E., Gbadegesin, R., A., Olumese, P. E., Omotade, O. O. (2008). Complexity of the msp2 locus and the severity of childhood malaria in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol*, 102(2), 95-102.
6. Anders, R. F., Adda, C. G, Foley, M., Norton, R. S. (2010). Recombinant protein vaccines against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Hum Vac Cin*, 6(1), 39-53.
7. Anderson, T. J., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whihworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U., Day, K. F. (2000). Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, 17(10), 1467-82.
8. ANFEL, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. (2014). *Paludisme*.
9. Anglaret, X. (2001). Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in sub-Saharan Africa. *Lancet*, 358, 1027-8.
10. Aniweh Y., Gao X., Gunalan, K., Preiser, P. R. (2016). PfRH2b specific monoclonal antibodies inhibit merozoite invasion. *Mol Microbiol*, 102(3), 386-404
11. ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie). (2013). Recensement Général de la population et de l’Habitat, de l’Agriculture et de l’Elevage. 2013.

12. Aoki, S., Li, J., Itagaki, S., Okech, B. A., Egwang, T. G., Matsuoka, H., Palacpac, N. M., Mitamura, T., Horii, T. (2002). Serine repeat antigen 5 (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. *J Biol Chem*, 277(49), 47533-40.
13. Applied Biosystems. (2009). A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. *Inc*, 1-20.
14. Aponte, J. J., Schellenberg, D., Egan, A., Breckenridge, A., Carneiro, I., Critchley, J., Danquah, I., Dodoo, A., Kobbe, R., Lell, B., May, J., Premji, Z., Sanz, S., Sevene, E., Soulaymani-Becheikh, R., Winstanley, P., Adjei, S., Anemana, S., Chandramohan, D., Issifou, S., Mockenhaupt, F., Owusu-Agyei, S., Greenwood, B., Grobusch, M. P., Kremsner, P. G., Macete, E. Mshinda, H., Newman, R. D., Slutsker, L., Tanner, M., Alonso, P., Menendez, C. (2009). Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*, 374(9700), 1533-42.
15. Ariev, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N. Kim, S. Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M. Bout, D. M., Menard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P. Le Bras, J., Berry, A., Barale, J. C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O. Menard, D. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50-5.
16. Artavanis-Tsakonas, K., Eleme, K., McQueen, K. L., Cheng N. W., Parham, P., Davis, D. M., Riley, E. M. (2003). Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*, 171(10), 5396-405.
17. Baird, J. K., Purnomo, Jones, T. R. (1992). Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86(1), 3-5.
18. Baird, J. K., Hoffman, S. L. (2004). Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis*, 39(9), 1336-45.
19. Baker, D. A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*, 172(2), 57-65.
20. Bannister, L. H., Mitchell, G. H., Butcher, G. A., Dennis, E. D., Cohen, S. (1986). Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell Tissue Res*, 245(2), 281-90.

21. Bannister, L. H., Dluzewski, A. R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, 16(2-3), 257-92.
22. Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., Mitchell, G. H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today*, 16(10), 427-33.
23. Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., Mitchell, G. H. (2000). Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology*, 121(Pt 3), 273-87.
24. Baraka, V., Ishengoma, D. S., Fransis, F., Minja, D. T., Madebe, R. A., Ngatunga, D., Van Geertruyden, J. P. (2015). High-level *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance with the concomitant occurrence of septuple haplotype in Tanzania. *Malar J*, 14, 439.
25. Baratin, M., Roetynck, S., Lépolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J. G., Alexopoulou, L., Kirschning, C. J., Gysin, J., Vivier, E., Ugolini, S. (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(41), 14747-52.
26. Barr, P. J., Green, K. M., Gibson, H. L., Bathurst, I. C., Quakyi, I. A., Kaslow, D. C. (1991). Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J Exp Med*, 174(5), 1203-8.
27. Barry, A. E., Arnott, A., (2014). Strategies for Designing and Monitoring Malaria Vaccines Targeting Diverse Antigens. *Front Immunol*. 5: 359.
28. Basco, L. K., Eldin de Pecoulas, P., Wilson, C. M., Le Bras, J., Mazabraud, A. (1995). Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 69(1), 135-8.
29. Baum, J., Tonkin, C. J., Paul, A. S., Rug, M., Smith, B. J., Gould, S. B., Richard, D., Pollard, T. D., Cowman, A. F. (2008). A malaria parasite forming regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe*, 3(3), 188-98.
30. Baum, J., Chen, L., Healer, J., Lopaticki, S., Boyle, M., Triglia, T., Ehlgren, F., Ralph, S. A., Beeson, J. G., Cowman, A. F. (2009). Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, 39(3), 371-80.

31. Bei, A. K., Membi, C. D., Rayner, J. C., Mubi, M., Ngasala, B., Sultan, A. A., Premji, Z., Duraisingh, M. T. (2007). Variant merozoite protein expression is associated with erythrocyte invasion phenotypes in *Plasmodium falciparum* isolates from Tanzania. *Mol Biochem Parasitol*, 153(1), 66-71.
32. Bennett, J. W., Yadava, A., Tosh, D., Sattabongkot, J., Komisar, J., Ware, L. A., McCarthy, W. F., Cowden, J. J., Regules, J., Spring, M. D., Paolino, K., Hartzell, J. D., Cummings, J. F., Richie, T. L., Lumsden, J., Kamau, E., Murphy, J., Lee, C., Parekh, F., Birkett, A., Cohen, J., Ballou, W. R., Polhemus, M. E., Vanloubbeeck, Y. F., Vekemans, J., Ockenhouse, C. F. (2016). Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01_B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(2), e0004423.
33. Berzins, K., Perlmann, H., Wahlin, B., Carlsson, J., Wahlgren, M., Udomsangpetch, R., Bjorkman, A., Patarroyo, M. E., Perlmann, P. (1986). Rabbit and human antibodies to a repeated amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen, Pf 155, react with the native protein and inhibit merozoite invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(4), 1065-9.
34. Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J. F., Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000309.
35. Betson, M., Jawara, M., Awolola, T. S. (2009). Status of insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae* s.l. from malaria surveillance sites in The Gambia. *Malaria J*, 8, 187.
36. Bickii, J., Basco, L. K., Ringwald, P. (1998). Assessment of three *in vitro* tests and an *in vivo* test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 36(1), 243-7.
37. Bogreau, H., Renaud, F., Bouchiba, H., Durand, P., Assi, S. B., Henry, M. C., Garnotel, E., Pradines, B., Fusai, T., Wade, B., Adehossi, E., Parola, P., Kamil, M. A., Puijalón, O., Rogier, C. (2006). Genetic Diversity and Structure of African *Plasmodium Falciparum* Populations in Urban and Rural Areas. *Am J Trop Med Hyg*, 74(6), 953-9.
38. Boussaroque, A., Fall, B., Madamet, M., Wade, K. A., Fall, M., Nakoulima, A., Fall, K B, Dione, P., Benoit, N., Diatta, B., Diemé, Y., Wade, B., Pradines, B. (2016). Prevalence of anti-malarial resistance genes in Dakar, Senegal from 2013 to 2014. *Malar J*, 15, 347.

39. Boutin, J. P., Pradines, B., Pages, F., Legros, F., Rogier, C., Migliani, R. (2005). Epidemiology of malaria. *Rev Prat*, 55(8), 833-40.
40. Bowman, S., Lawson, D., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Churcher, C. M., Craig, A., Davies, R. M., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Gwilliam, R., Hamlin, N., Harris, D., Holroyd, S., Hornsby, T., Horrocks, P., Jagels, K., Jassal, B., Kyes, S., McLean, J., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutter, S., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Whitehead, S., Woodward, J. R., Newbold, C., Barrell, B. G. (1999). The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 400(6744), 532-8.
41. Boyle, M. J., Richards, J. S., Gilson, P. R., Chai, W., Beeson, J. G. (2010). Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood*, 115(22), 4559-68.
42. Brooks, D. R., Wang, P., Read, M., Watkins, W. M., Sims, P. F., Hyde, J. E. (1994). Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*, 224(2), 397-405.
43. Burgess, R. W., and Young, M. D. (1959). The development of pyrimethamine resistance by *Plasmodium falciparum*. *Bull World Health Organ*, 20(1), 37-46.
44. Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Crosnier, C., Campos, M. G., Wanaguru, M., Nguon, C., Kwiatkowski, D. P., Wright, G. J., and Rayner, J. C. (2013). A full-length recombinant *Plasmodium falciparum* PfRH5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common PfRH5 genetic variants. *Vaccine*, 31(2), 373-9.
45. Bwijo, B., Kaneko, A., Takechi, M., Zungu, I. L., Moriyama, Y., Lum, J. K., Tsukahara, T., Mita, T., Takahashi, N., Bergqvist, Y., Björkman, A., Kobayakawa, T. (2003). High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop*, 85(3), 363-373.
46. Bzik, D. J., Li, W. B., Horil, T., Inselburg, J. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(23), 8360-4.
47. Camus, D., Hadley, T. J. (1985). A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science*, 230(4725), 553-6.

48. Caputo, B., Nwakanma, D., Jawara, M., Adiamoh, M., Dia, I., Konate, L., Petrarca, V., Conway, D. J., Torre, A. D. (2008). *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae s.s.* *Malar J*, 7, 182.
49. Cattamanchi, A., Kyabayinze, D., Hubbard, A., Rosenthal, P. J., Dorsey, G. (2003). Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of *msp-1*, *msp-2*, and *glurp*. *Am J Trop Med Hyg*, 68(2), 133-9.
50. Chen, Q., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P., Wahlgren, M. (1998). Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 394(6691), 392-5.
51. Chen, L., Lopatnicki, S., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Uboldi, A. D., Tham, W. H., O'Neill, M. T., Richard, D., Baum, J., Ralph, S. A., Cowman, A. F. (2011). An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*, 7, e1002199.
52. Chin, W., Contacos, P. G., Coatney, G. R., Kimball, H. R. (1965). A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*, 149(3686), 865.
53. Chin, W., Contacos, P. G., Collins, W. E., Jeter, M. H., Alpert, E. (1968). Experimental mosquito transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg*, 17(3), 355-8.
54. Chitnis, C. E., Blackman, M. J. (2000). Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol Today*, 16(10), 4115-5.
55. Chiu, C. Y., Healer, J., Thompson, J. K., Chen, L., Kaul, A., Savergave, L., Raghuvanshi, A., Li Wai Suen, C. S., Siba, P. M., Schofield, L., Mueller, I., Cowman, A. F., Hansen, D. S. (2014). Association of antibodies to *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 5 with protection from clinical malaria. *Front Microbiol*, 5, 314.
56. Chuang, I., Sedegah, M., Cikatelli, S., Spring, M., Polhemus, M., Tamminga, C., Patterson, N., Guerrero, M., Bennett, J.W., McGrath, S., Ganeshan, H., Belmonte, M., Farooq, F., Abot, E., Banania, J. G., Huang, J., Newcomer, R., Rein, L., Lilitit, D., Richie, N. O., Wood, C., Murphy, J., Sauerwein, R., Hermsen, C. C., McCoy, A. J., Kamau, E., Cummings, J., Komisar, J., Sutamihardja, A., Shi, M., Epstein, J. E., Maiolatesi, S., Tosh, D., Limbach, K., Angov, E., Bergmann-Leitner, E., Bruder, J. T., Doolan, D. L., King, C. R., Carucci, D., Dutta, S., Soisson, L., Diggs, C.,

- Hollingdale, M. R., Ockenhouse, C. F, Richie, T. L. (2013). DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding *P. falciparum* CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One*, 8(2), e55571.
57. Cnops, L., Boderie, M., Gillet, P., Van Esbroeck, M., Jacobs, J. (2011). Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. *Malar J*, 10, 67.
58. Cogswell, F. B. (1992). The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev*, 5(1), 26-35.
59. Cohen, S., McGregor, I. A., Carrington, S. (1961). Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, 192, 733-7.
60. Collins, W. E., Warren, M., Skinner, J. C., Fredericks, H. J. (1968). Studies on the relationship between fluorescent antibody response and ecology of malaria in Malaysia. *Bull World Health Organ*, 39(3), 451-63.
61. Collins, W. E. and Jeffery, G. M. (2005). *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev*, 18(3), 570-81.
62. Cowman, A. F., Morry, M. J., Biggs, B. A., Cross, G. A., Foote, S. J. (1988). Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), 9109-13.
63. Cowman, A. F., Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755-66.
64. Cox-singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., Singh, B. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, 46 (2), 165-71.
65. Craig, M. H., Sharp, B. L. (1997). Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(3), 279-82.
66. Craig, M. H., Snow, R. W., Le Sueur, D. (1999). A climate-based distribution model of malaria transmission in sub-Saharan Africa. *Parasitol Today*, 15 (3), 105-11.
67. Crompton, P. D., Pierce, S. K., Miller, L. H. (2010). Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*, 120(12), 4168-78.

68. Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 480(7378), 534-7.
69. Cruz, R. E., Shokoples, S. E., Manage, D. P., Yanow, S. K. (2010). High-Throughput Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* dhfr Gene by Asymmetric PCR and Melt-Curve Analysis. *J Clin Microbiol*, 48(9), 3081-7.
70. Cummings, J. F., Spring, M. D., Schwenk, R. J., Ockenhouse, C. F., Kester, K. E., Polhemus, M. E., Walsh, D. S., Yoon, I. K., Prosperi, C., Jumpan, LY., Lanar, D. E., Krzych, U., Hall, B. T., Ware, L. A., Stewart, V. A., Williams, J., Dowler, M., Nielsen, R. K., Hillier, C. J., Giersing, B. K, Dubovsky, F., Malkin, E., Tucker, K., Dubois, M. C., Cohen, J. D., Ballou, W. R., Heppner, D. G, Jr. (2010). Recombinant liver stage antigen-1 (LSA-1) formulated with AS01 or AS02 is safe, elicits high titer antibody and induces IFN-gamma/IL-2 CD4+ T cells but does not protect against experimental *Plasmodium falciparum* infection. *Vaccine*, 28(31), 5135-44.
71. Das, S., Chakraborty, S. P, Hati, A., Roy, S. (2013). Malaria treatment failure with novel mutation in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolatereductase (*pf dhfr*) gene in Kolkata, West Bengal, India. *Int J Antimicrob Agents*, 41(5), 447-51.
72. Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Sene, P. D., Sabeti, P. C., Volkman, S. K., Mboup, S., Wirth, D. F. (2012). Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6), 2976-86.
73. Daniels, R., Chang, H. H., Sene, P. D., Park, D.C., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Hamilton, E. J., Lukens, A. K., Tyne, D. V., Mboup, S., Sabeti, P. C., Ndiaye, D., Wirth, D. F., Hartl, D. L., Volkman, S. K. (2013). Genetic surveillance detects both clonal and epidemic transmission of malaria following enhanced intervention in Senegal. *PLoS One*, 8(4), e60780.
74. Daniels, R. F., Schaffner, S. F., Wenger, E. A., Proctor, J. L., Chang, H. H., Wong, W., Baro, N., Ndiaye, D., Fall, F. B., Ndiop, M., Ba, M., Milner, D. A. Jr., Taylor, T. E., Neafsey, D. E., Volkman, S. K., Eckhoff, P. A., Hartl, D. L., Wirth, D. F. (2015). Modeling malaria genomics reveals transmission decline and rebound in Senegal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(22), 7067-72.

75. de Barra, E., Hodgson, S. H., Ewer, K. J., Bliss, C. M., Hennigan, K., Collins, A., Berrie, E., Lawrie, A. M., Gilbert, S. C., Nicosia, A., McConkey, S. J., Hill, A. V. (2014). A phase Ia study to assess the safety and immunogenicity of new malaria vaccine candidates ChAd63 CS administered alone and with MVA CS. *PLoS One*, 9(12), e115161.
76. de Monbrison, F., Angel, C., Stall, A., Kaiser, K., Picot, S. (2003). Simultaneous identification of the four human Plasmodium species and quantification of Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97(4), 387-90
77. de Pécoulas, P. E., Basco, L. K., Wilson, C. M., Le Bras, J., Mazabraud, A. (1996). Molecular Characterization of Airport Malaria. *J Travel Med*, 3(3), 179-81.
78. Deitsch, K. W., del Pinal, A., Wellems, T. E. (1999). Intra-cluster recombination and var transcription switches in the antigenic variation of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 101(1-2), 107-16.
79. Dent, A. E., Bergmann-Leitner, E. S., Wilson, D. W., Tisch, D. J., Kimmel, R., Vulule J., Sumba, P. O., Beeson, J. G., Angov, E., Moormann, A. M., Kazura, J. W. (2008). Antibody-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*: relationship to age and protection from parasitemia in Kenyan children and adults. *PLoS One*, 3(10), e3557.
80. Douglas, A. D., Williams, A. R., Illingworth, J. J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A. L., Wyllie, D. H., Crosnier, C., Miura, K., Wright, G. J., Long, C. A., Osier, F. H., Marsh, K., Turner, A. V., Hill, A. V., Draper, S. J. (2011). The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccineinducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun*, 2, 601.
81. Douglas, A. D., Williams, A. R., Knuepfer, E., Illingworth, J. J., Furze, J. M., Crosnier, C., Choudhary, P., Bustamante, L.Y., Zakutansky, S. E., Awuah, D. K., Alanine, D. G., Theron, M., Worth, A., Shimkets, R., Rayner, J. C., Holder, A. A., Wright, G. J., Draper, S. J. (2014). Neutralization of Plasmodium falciparum merozoites by antibodies against PfRH5. *J Immunol*, 192(1), 245-58.
82. Douglas, A. D., Baldeviano, G. C., Lucas, C. M., Lugo-Roman, L. A., Crosnier, C., Bartholdson, S. J., Diouf, A., Miura, K., Lambert, L. E., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Milne, K. H., Illingworth, J. J., Spencer, A. J., Hjerrild, K. A., Alanine, D. G., Turner, A. V., Moorhead, J. T., Edgel, K. A., Wu, Y., Long, C. A., Wright, G. J., Lescano, A. G., Draper, S. J. (2015). A PfRH5-based vaccine is efficacious against heterologous

- strain blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in aotus monkeys. *Cell Host Microbe*, 17(1), 130-9.
83. Dowling, M. A. C., Shut, G. T. (1966). A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scarcely malaria parasitemia. *Bull World Health Organ*, 34(2), 249-67.
 84. Dreyer, A. M., Matile, H., Papastogiannidis, P., Kamber, J., Favuzza, P., Voss, T. S., Wittlin, S., Pluschke, G. (2012). Passive immunoprotection of *Plasmodium falciparum*-infected mice designates the CyRPA as candidate malaria vaccine antigen. *J Immunol*, 188(12), 6225-37.
 85. Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*, 28(7), 1007-13.
 86. Dudareva, M., Andrews, L., Gilbert, S. C., Bejon, P., Marsh, K., Mwacharo, J., Kai, O., Nicosia, A., Hill, A. V. (2009). Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan children, in the context of vaccine vector efficacy. *Vaccine*, 27(27), 3501-4.
 87. Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden G. I., Cowman, A. F. (2003). Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*, 22(5), 1047-57.
 88. Dutta, S., Lalitha, P. V., Ware, L. A., Barbosa, A., Moch, J. K., Vassell, M. A., Fileta, B. B., Kitov, S., Kolodny, N., Heppner, D. G., Haynes, J. D., Lanar, D. E. (2002). Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 70(6), 3101-10.
 89. Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C., Shiroishi, T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, 187(4178), 748-50.
 90. Dvorin, J. D., Bei, A. K., Coleman, B. I., Duraisingh, M. T. (2010). Functional diversification between two related *Plasmodium falciparum* merozoite invasion ligands is determined by changes in the cytoplasmic domain. *Mol Microbiol*, 75(4), 990-1006.
 91. Eksi, S., Czesny, B., Gemert, G. J. V., Sauerwein, R. W., Eling, W., Williamson, K. C., (2006). Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol*, 61, (4), 991–8.

92. El Sahly, H. M., Patel, S. M., Atmar, R. L., Lanford, T. A., Dube, T., Thompson, D., Sim, B. K., Long, C., Keitel, W. A. (2010). Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic. *Clin Vaccine Immunol*, 17(10), 1552-9.
93. Ennis, J., Kocherginsky, M., Schumm, L. P., Worcester, E., Coe, F. L., Josephson, M. A. (2009). Trends in kidney donation, among kidney stone formers: a survey of US transplant centers. *Am J Nephrol*, 30(1), 12-8.
94. Esen, M., Kremsner, P. G., Schleucher, R., Gassler, M., Imoukhuede, E. B., Imbault, N., Leroy, O., Jepsen, S., Knudsen, B. W., Schumm, M., Knobloch, J., Theisen, M., Mordmuller, B. (2009). Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*, 27(49), 6862-8.
95. Faye, B., Ndiaye, M., Ndiaye, J. L., Annie, A., Tine, R. C., Lo, A. C., Ndiaye, M., Sow, D., De Sousa, A., Gaye, O. (2011). Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during the intermittent preventive treatment in infants coupled with the expanded program immunization in Senegal. *Parasitol Res*, 109(1), 133-8.
96. Felger, I., Tavul, L., Kabintik, S., Marshall, V., Genton, B., Alpers, M., Beck, H. P., (1994). *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp parasitol*, 79(2), 106-16.
97. Fenton, B., Clark, J. T., Khan, C. M., Robinson, J. V., Walliker, D., Ridley, R., Scaife, J. G., McBride, J. S. (1991). Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol*, 11(2), 963-71.
98. Foote, S. J., Galatis, D., Cowman, A. F. (1990). Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(8), 3014-7.
99. Frevert, U. (2004). Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, 20(9), 417-24.
100. Gan, L. S. H., Loh, J. (2010). Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. *Malar J*, 9, 134.

101. Gao, X., Yeo, K. P., Aw, S. S., Kuss, C., Iyer, J. K., Genesan, S., Rajamanonmani, R., Lescar, J., Bozdech, Z., Preiser, P. R. (2008). Antibodies targeting the PfRH1 binding domain inhibit invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites. *PLoS Pathog*, 4(7), e1000104.
102. Gao, X., Gunalan, K., Yap, S. S. L., Preiser, P. R. (2013). Triggers of key calcium signals during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*, 4, 2862.
103. Gardner, M. J., Tettelin, H., Carucci, D. J., Cummings, L. M., Aravind, L., Koonin, E. V., Shallom, S., Mason, T., Yu, K., Fujii, C., Pederson, J., Shen, K., Jing, J., Aston, C., Lai, Z., Schwartz, D. C., Pertea, M., Salzberg, S., Zhou, L., Sutton, G. G., Clayton, R., White, O., Smith, H. O., Fraser, C. M., Adams, M. D., Venter, J. C., Hoffman, S. L. (1998). Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 282(5391), 1126-32.
104. Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498-511.
105. Gaur, D., and Chitnis, C. E. (2011). Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr Opin Microbiol*, 14(4), 422-8.
106. Gaur, D., Mayer, D. C., Miller, L. H. (2004). Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*, 34(13-14), 1413-29.
107. Genrich, G. L., Guarner, J., Paddock, C. D., Shieh, W. J., Greer, P. W., Barnwell, J. W., Zaki, S. R. (2007). Fatal malaria infection in travelers: novel immunohistochemical assays for the detection of *Plasmodium falciparum* in tissues and implications for pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg*, 76(2), 251-9.

108. Genton, B., Betuela, I., Felger, I., Al-Yaman, F., Anders, R. F., Saul, A., Rare, L., Baisor, M., Lorry, K., Brown, G. V., Pye, D., Irving, D. O., Smith, T. A., Beck, H. P., Alpers, M. P. (2002). A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*, 185 (6), 820-7.
109. Genton, B., and Reed, Z. H. (2007). Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. *Curr Opin Infect Dis*, 20(5), 467-75.
110. Gerold, P. L., Schofield, M. J., Blackman, A. A., Holder, Schwarz, R.T. (1996). Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins 1 and 2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 75(2), 131-43.
111. Gilberger, T. W., Thompson, J. K., Reed, M. B., Good, R. T., Cowman, A. F. (2003). The cytoplasmic domain of the *Plasmodium falciparum* ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *J Cell Biol*, 162(2), 317-27.
112. Gilberger, T. W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., Cowman, A. F. (2003). A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *J Biol Chem*, 278(16), 14480-6.
113. Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., Crabb, B. S. (2006). Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics*, 5(7), 1286-99.
114. Gilson, P. R., Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Int J Parasitol*, 39(1), 91-6.
115. Glushakova, S., Yin, D., Li, T., Zimmerberg, J. (2005). Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol*, 15(18), 1645-50.
116. Goel, V., K., Li, X., Chen, H., Liu, S. C., Chishti, A. H., Oh, S. S. (2003). Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5164-9.

117. Goman, M., Langsley, G., Hyde, J. E., Yankovsky, N. K., Zolg, J. W., Scaife, J. G. (1982). The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridisation. *Mol Biochem Parasitol*, 5(6), 391-400.
118. Good, M. F., Doolan, D. L. (2010). Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity*, 33(4), 555-66.
119. Grassi, B. and Feletti, R. (1890). Parasites malariques chez les oiseaux. *Arch. Ital. Biol.* 13:297-300.
120. Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H., Duffy, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 118(4), 1266-76.
121. Gunalan, K. X., Gao, K. J., Liew, Preiser, P. R. (2011). Differences in erythrocyte receptor specificity of different parts of the *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 2a. *Infect Immun*, 79(8), 3421-30.
122. Gunalan, K., Gao, X., Yap, S. S., Huang, X., Preiser P. R. (2013). The role of the reticulocyte-binding-like protein homologues of *Plasmodium* in erythrocyte sensing and invasion. *Cell Microbiol*, 15(1), 35-44.
123. Hamyuttanakom, P., McBride, J. S., Donachie, S., Heidrich, H. G., Ridley, R. G. (1992). Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 55(1-2), 177-86.
124. Harbach, R. E. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res*, 94(6), 537-53.
125. Happi, C. T., Gbotosho, G. O., Folarin, O. A. Akinboye, D. O., Yusuf, B.O., Ebong, O. O., Sowunmi, A., Kyle, D. E., Milhous, W., Wirth D. F., Oduola, A. M. J. (2005). Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related *in vivo* sulfadoxine/pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop*, 95: 183–93.
126. Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., Benz, D., Gething, P. W., Howes, R. E., Patil, A. P., Temperley, W. H., Bangs, M. J., Chareonviriyaphap, T., Elyazar, I. R., Harbach, R. E., Hemingway, J., Manguin, S., Mbogo, C. M., Rubio-Palis, Y., Godfray, H. C. (2010). Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human. *Plos Med*, 7(2), e1000209.

127. Hayton, K., Gaur, D., Liu, A., Takahashi, J., Henschen, B., Singh, S., Lambert, L., Furuya, T., Bouttenot, R., Doll, M., Nawaz, F., Mu, J., Jiang, L., Miller, L. H., Wellems, T. E. (2008). Erythrocyte binding protein PfrRH5 polymorphisms determine species-specific pathways of *Plasmodium falciparum* invasion. *Cell Host Microbe*, 4(1), 40-51.
128. Hänscheid, T., Grobusch, M. P. (2002). How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends in Parasitol*, 18(9), 395-8.
129. Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R., Riley, E. (1997). Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun*, 65(8), 3017-23.
130. Henry, M., Diallo, I., Bordes, J., Ka, S., Pradines, B., Diatta, B., MBaye, P. S., Sane, M., Thiam, M., Gueye, P. M., Wade, B., Touze, J. E., Debonne, J. M., Rogier, C., Fusai, T. (2006). Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 75(1), 146-51.
131. Hermsen, C. C., Verhage, D. F., Telgt, D. S., Teelen, K., Bousema, J. T., Roestenberg, M., Bolad, A., Berzins, K., Corradin, G., Leroy, O., Theisen, M., Sauerwein, R. W. (2007). Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine*, 25(15), 2930-40.
132. Hill, A. V. (2006). Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol*, 6(1), 21-32.
133. Hinterberg, K., Mattei, D., Wellems, T. E., Scherf, A. (1994). Interchromosomal exchange of a large subtelomeric segment in a *Plasmodium falciparum* cross. *EMBO J*, 13(17), 4174-80.
134. Hodgson, S. H., Ewer, K. J., Bliss, C. M., Edwards, N. J., Rampling, T., Anagnostou, N. A., de Barra, E., Havelock, T., Bowyer, G., Poulton, I. D., de Cassan, S., Longley, R., Illingworth, J. J., Douglas, A. D., Mange, P. B., Collins, K. A., Roberts, R., Gerry, S., Berrie, E., Moyle, S., Colloca, S., Cortese, R., Sinden, R. E., Gilbert, S. C., Bejon, P., Lawrie, A. M., Nicosia, A., Faust, S. N., Hill, A. V. (2014). Evaluation of the Efficacy of ChAd63-MVA Vectored Vaccines Expressing Circumsporozoite Protein and ME-TRAP Against Controlled Human Malaria Infection in Malaria-Naive Individuals. *J Infect Dis*. 211(7), 1076-86.

135. Hoffman, S. L., Bancroft, W. H., Gottlieb, M., James, S. L., Burroughs, E. C., Stephenson, J. R., Morgan, M. J. (1997). Funding for malaria genome sequencing. *Nature*, 387(6634), 647.
136. Hoffman, S. L., Vekemans, J., Richie, T. L., Duffy, P. E. (2015). The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med*. 49(Suppl 4), S319-33.
137. Horii, T., Shirai, H., Jie, L., Ishii, K. J., Palacpac, N. Q, Tougan, T., Hato, M., Ohta, N., Bobogare, A., Arakaki, N., Matsumoto, Y., Namazue, J., Ishikawa, T., Ueda S., Takahashi, M. (2010). Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitol Int*, 59(3), 380-6.
138. Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., Hay, S. I. (2016). Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*, 95, 15-34.
139. Hyde, J. (2005). Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop*. 94, 191-206.
140. Ishengoma, D. S., Lwitiho, S., Madebe, R. A., Nyagonde, N., Persson, O., Vestergaard, L. S., Bygbjerg, I. C., Lemnge, M. M., Alifrangis, M. (2011). Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence. *Malar J*, 10, 6.
141. Jelinek, T., Rønn, A. M., Lemnge, M. M., Curtis, J., Mhina, J., Duraisingh, M. Bygbjerg, I. C., Warhurst, D. C. (1998). Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health*, 3, 605-9.
142. Jennings, C. V., Ahouidi, A. D., Zilvermit, M., Bei, A. K., Rayner, J., Sarr, O., Ndir, O., Wirth, D. F., Mboup, S., Duraisingh, M. T. (2007). Molecular analysis of erythrocyte invasion in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Infect Immun*, 75(7), 3531-8.
143. Jepsen, M. P., Jogdand, P. S., Singh, S. K., Esen, M., Christiansen, M., Issifou, S., Hounkpatin, A. B., Ateba-Ngoa, U., Kremsner, P. G., Dziegiel, M. H., Olesen-Larsen, S., Jepsen, S., Mordmüller, B., Theisen, M. (2013). The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. *J infect Dis*, 208(3), 479-88.

144. Jiang, G., Daubenberger, C., Huber, W., Matile, H., Tanner, M., Pluschke, G. (2000). Sequence diversity of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the Kilombero District, Tanzania. *Acta Trop*, 74(1), 51-61.
145. Jones, S. A. (1954). Resistance of *P. falciparum* and *P. malariae* to pyrimethamine (daraprim) following mass treatment with this drug; a preliminary note. *East Afr Med J*, 31(2), 47-9.
146. Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., Kanbara, H. (2004). Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 10(12), 2211-3.
147. Jordan, S. J., Branch, O. H., Castro, J. C., Castro, J. C., Oster, R. A., Rayner, J. C. (2009). Genetic diversity of the malaria vaccine candidate *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 in a hypoendemic transmission environment. *Am J Trop Med Hyg*, 80(3), 479-86.
148. Kaneko, O., Mu, J., Tsuboi, T., Su, X., Torii, M. (2002). Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 220-kDa protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 121(2), 275-8.
149. Karbwang, J., Tasanor, O., Kanda, T., Wattanagoon, Y., Ibrahim, M., Na-Bangchang, K., Thanavibul, A., Rooney, W. (1996). ParaSight-F test for the detection of treatment failure in multidrug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(5), 513-5.
150. Kauth, C. W., Epp, C., Bujard, H., and Lutz, R. (2003). The merozoite surface protein 1 complex of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: interactions and arrangements of subunits. *J Biol Chem*, 278(25), 22257-64.
151. Kayentao, K., Kodio, M., Newman, R. D., Maiga, H., Doumtabe, D., Ongoiba, A., Coulibaly, D., Keita, A. S., Maiga, B., Mungai, M., Parise, M. E., Doumbo, O. (2005). Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *J Infect Dis*, 191(1), 109-16.
152. Kedzierski, L., Black, C. G., Coppel, R. L. (2000). Immunization with recombinant *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 protects *mice* against lethal challenge. *Infect Immun*, 68(10), 6034-7.

153. Kidima, W., Nkwengulila, G., Premji, Z., Malisa, A. et Mshinda, H., (2006). dhfr and dhps mutations in *Plasmodium falciparum* isolates in Mlandizi, Kibaha, Tanzania: association with clinical outcome. *Tanzania Health Research Bulletin*. 8, 50-54.
154. Kilian, A. H., Mughusu, E. B., Kabagambe, G., Von Sonnenburg, F. (1997). Comparison of two rapid HRP-2 based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(6), 666-7.
155. Kocken, C. H., Withers-Martinez, C., Dubbeld, M. A., van der Wel, A., Hackett, F., Valderrama, A., Blackman, M. J., Thomas, A. W. (2002). High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun*, 70(8), 4471-6.
156. Kojima, S., Nagamine, Y., Hayano, M., Looareesuwan, S., Nakanishi, K. (2004). A potential role of interleukin 18 in severe *falciparum* malaria. *Acta Trop*, 89(3), 279-84.
157. Korbel, D. S., Newman, K. C., Almeida, C. R., Davis, D. M., Riley, E. M. (2005). Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*, 175(11), 7466-73.
158. Krotoski, W. A., Collins, W. E., Bray, R. S., Garnham, P. C., Cogswell, F. B., Gwadz, R. W., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L. C., Stanfill, P. S., (1982). Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*, 31(6), 1291-3.
159. Kyes, S. A., Kraemer, S. M., Smith, J. D. (2007). Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell*, 6(9), 1511-20.
160. Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001276.
161. Lantos, P. M., Ahouidi, A. D., Bei, A. K., Jennings, C.V., Sarr, O., Ndir O., Wirth, D. F., Mboup, S., Duraisingh, M. T. (2009). Erythrocyte invasion profiles are associated with a common invasion ligand polymorphism in Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 136(1), 1-9.

162. Laurens, M. B., Thera, M. A., Coulibaly, D., Ouattara, A., Kone, A. K., Guindo, A. B., Traore, K., Traore, I., Kouriba, B., Diallo, D. A., Diarra, I., Daou, M., Dolo, A., Tolo, Y., Sissoko, M. S., Niangaly, A., Sissoko, M., Takala-Harrison, S., Lyke, K. E., Wu, Y., Blackwelder, W. C., Godeaux, O., Vekemans, J., Dubois, M. C., Ballou, W. R., Cohen, J., Dube, T., Soisson, L., Diggs, C. L., House, B., Bennett, J. W., Lanar, D. E., Dutta, S., Heppner, D. G., Plowe, C. V., Doumbo, O. K. (2013). Extended Safety, Immunogenicity and Efficacy of a Blood-Stage Malaria Vaccine in Malian Children: 24-Month Follow-Up of a Randomized, Double-Blinded Phase 2 Trial. *PLoS ONE*, 8(11), e79323.
163. Lavazec, C., Bourgoignie, C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. *Microbes and infect*, 10(8), 845–9.
164. Le Bras, J., and Durand, R. (2003). The mechanism of resistance to antimalarial drugs in Plasmodium falciparum. *Fundam Clin Pharmacol*, 17, 147-53.
165. Lee, N., Baker, J., Bell, D., McCarthy, J., Cheng, Q. (2006). Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. *J Clin Microbiol*, 44(12), 4547-9.
166. Leykauf, K., Treeck, M., Gilson, P. R., Nebl, T., Bräulke, T., Cowman, A. F., Gilberger, T. W., Crabb, B. S. (2010). Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000941.
167. Lin, C. S., Ubaldi, A. D., Marapana, D., Marapana, D., Czabotar, P. E., Epp, C., Bujard, H., Taylor, N. L., Perugini, M. A., Hodder, A. N., Cowman, A. L. (2014). The Merozoite Surface Protein 1 Complex Is a Platform for Binding to Human Erythrocytes by Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, 289, 25655-69.
168. Lobo, C-A., Rodriguez, M., Reid, M., Lustigman, S. (2003). Glycophorin C is the receptor for the Plasmodium falciparum erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*, 101(11), 4628-31.
169. Lopatnicki, S., Maier, A. G., Thompson, J., Wilson, D. W., Tham, W. H., Triglia, T. Gout, A., Speed, T. P., Beeson, J. G., Healer, J., Cowman, A. F. (2011). Reticulocyte and Erythrocyte Binding-Like Proteins Function Cooperatively in Invasion of Human Erythrocytes by Malaria Parasites. *Infect Immun*, 79(3), 1107-17.

170. Lowe, B. S., Jeffa, N. K., New, L., Pedersen, C., Engbaek, K., Marsh, K. (1996). Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(1), 34-6.
171. Luchavez, J., Espino, F., Curameng, P., Espina, R., Bell, D., Chiodini, P., Nolder, D., Sutherland, C., Lee, K. S., Singh, B. (2008). Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, 14(5), 811-3.
172. Luty, A. J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Nussenzweig, R. S., Kremsner, P. G (1999). Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis*, 179(4), 980-8.
173. Lyon, J. A., Haynes, J. D. (1986). *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. *J Immunol*, 136(6), 2245-51.
174. Malik, A., Egan, J. E., Houghten, R. A., Sadoff, J. C., Hoffman, S. L. (1991). Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3300-4.
175. Maier, A. G., Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., Cowman, A. F. (2003). *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med*, 9(1), 87-92.
176. Makler, M. T., Palmer, C. J., Ager, A. L. (1998). A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 92(4), 419-33.
177. Makler, M. T., Piper, R. C., Milhous, W. K. (1998). Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitol Today*, 14(9), 376-7.
178. Mayer, D. C., Mu, J. B., Kaneko, O., Duan, J., Su, X. Z., Miller, L. H. (2004). Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand JESEBL/EBA-181 alters its receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2518-23.
179. Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., Miller, L. H. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13), 5348-52.

180. Mbacham, W. F., Evehe, M, S., Netongo, P. M., Ateh, I. A., Mimche, P. N., Ajua, A., Nji, A. M., Domkam Irene, I., Echouffo-Tcheugui, J. B., Tawe, B., Hallett, R., Roper, C., Targett, G., Greenwood, B., (2010). Efficacy of amodiaquine, sulphadoxine / pyrimethamine and their combination for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in Cameroon at the time of policy change to artemisinin-based combination therapy. *Malar J*, 9: 34.
181. McCollum, A. M., Schneider, K. A., Griffing, S. M., Zhou, Z., Kariuki, S., Ter-Kuile, F., Shi, Y. P., Slutsker, L., Lal, A. A., Udhayakumar, V., Escalante, A. A. (2012). Differences in selective pressure on *dhps* and *dhfr* drug resistant mutations in western Kenya. *Malar J*, 11, 77.
182. McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature*, 381(6582), 482.
183. Menard, D., Djalle, D., Yapou, F., Manirakiza, A., Talarmin, A. (2006). Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in Bangui, Central African Republic. *Am J Trop Med Hyg*, 74: 205–10.
184. Meuwissen, J. H. (1961). Resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine and proguanil in Netherlands New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*, 10(2), 135-9.
185. Méchain, M. (2015). Un vaccin contre le paludisme à portée de main : quelle place dans la stratégie mondiale ? *mt pédiatrie*, 18(3), 133-8.
186. Miller, L. H., Roberts, T., Shahabuddin, McCutchan, T. F. (1993). Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* mérozoïte surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol*, 59(1), 1-14.
187. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673-9.
188. Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. Z., Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19(2), 156-67.
189. Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., Ward, G. E. (2005). Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion. *Mol Biol Cell*, 16(9), 4341-9.

190. Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., (2004). Apical membrane antigen1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun J*, 72(1), 154-8.
191. Mombo-Ngoma, G., Oyakhirome, S., Ord, R., Gabor, J. J., Greutelaers, K. C., Profanter, K., Greutelaers, B., Kurth, F., Lell, B., Kun, J. F., Issifou, S., Roper, C., Kremsner, P. G., Grobusch M. P. (2011). High prevalence of dhfr triple mutant and correlation with high rates of sulphadoxine-pyrimethamine treatment failures *in vivo* in Gabonese children. *Malar J*, 10, 123.
192. Moreno, A., Joyner, C. (2015). Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon ? *Curr Opin Immunol*, 35, 98-106.
193. Morris, U., Aydin-Schmidt, B., Shakely, D., Martensson, A., Jornhagen, L., Ali, A. S., Msellem, M. I., Petzold, M., Gil, J. P., Ferreira, P. E., Bjorkman, A. (2013). Rapid diagnostic tests for molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* malaria - assessment of DNA extraction methods and field applicability. *Malar J*, 12, 106.
194. Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., Sircoulon, J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext Paris*, 428.
195. Mubi, M., Kakoko, D., Ngasala, B., Premji, Z., Peterson, S., Bjorkman, A., Mårtensson, A. (2013). Malaria diagnosis and treatment practices following introduction of rapid diagnostic tests in Kibaha District, Coast Region, Tanzania. *Malar J*, 12, 293.
196. Nagamine, Y., Hayano, M., Kashiwamura, S., Okamura, H., Nakanishi, K., Krudsod, S., Wilairatana, P., Looareesuwan, S., Kojima, S. (2003). Involvement of interleukin-18 in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97(2), 236-41.
197. Ndiaye, S., Ayad, M. (2009). Enquête Nationale sur le Paludisme au Sénégal 2008-2009.
198. Ndiaye, D., Daily, J. P., Sarr, O., Ndir, O., Gaye, O., Mboup, S., Wirth, D. F. (2005). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health*, 10(11), 1176-9.

199. Ndiaye, D., Dieye, B., Ndiaye, Y. D., Tyne, V. D., Daniels, R., Bei, A. K., Mbaye, A., Valim, C., Lukens, A., Mboup, S., Ndir, O., Wirth, D. F., Volkman, S. (2013). Polymorphism in dhfr/dhps genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 3, 135-42.
200. Neafsey, D. E., Juraska, M., Bedford, T., Benkeser, D., Valim, C., Griggs, A., Lievens, M., Abdulla, S., Adjei, S., Agbenyega, T., Agnandji, S. T., Aide, P., Anderson, S., Ansong, D., Aponte, J. J., Asante, K. P., Bejon, P., Birkett, A. J., Bruls, M., Connolly, K. M., D'Alessandro, U., Dobaño, C., Gesase, S., Greenwood, B., Grimsby, J., Tinto, H., Hamel, M. J., Hoffman, I., Kamthunzi, P., Kariuki, S., Kremsner, P. G., Leach, A., Lell, B., Lennon, N. J., Lusingu, J., Marsh, K., Martinson, F., Molel, J. T., Moss, E. L., Njuguna, P., Ockenhouse, C. F., Ogutu, B. R., Otieno, W., Otieno, L., Otieno, K., Owusu-Agyei, S., Park, D. J., Pellé, K., Robbins, D., Russ, C., Ryan, E. M., Sacarlal, J., Sogoloff, B., Sorgho, H., Tanner, M., Theander, T., Valea, I., Volkman, S. K., Yu, Q., Lapierre, D., Birren, B. W., Gilbert, P. B., Wirth, D. F. (2015). Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. *N Engl J Med*, 373, 2025-37.
201. Ng, O. T., Ooi, E. E., Lee, C. C., Lee, P. J., Ng, L. C., Pei, S. W., Tu, T. M., Loh, J. P., Leo, Y. S. (2008). Naturally acquired human Plasmodium knowlesi infection, Singapore. *Emerg Infect Dis*, 14(5), 814-6
202. Nijhout, M. M., Carter, R. (1978). Gamete development in malaria parasites: Bicarbonate-dependent stimulation by pH *in vitro*. *Parasitology*, 76(1), 39-53.
203. O'Donnell, R. A., de Koning-Ward, T. F., Burt, R. A., Bockarie, M., Reeder, J. C., Cowman, A. F., Crabb, B. S. (2001). Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*, 193(12), 1403-12.
204. O'Meara, D. (2001). Molecular tools for nucleic acid analysis. Stockholm: Dep. Biotechnology, Royal Institute of Technology, KTH.
205. Ogutu, B. R., Apollo, O. J., McKinney, D., Okoth, W., Siangla, J., Dubovsky, F., Tucker, K., Waitumbi, J. N., Diggs, C., Wittes, J., Malkin, E., Leach, A., Soisson, L. A., Milman, J. B., Otieno, L., Holland, C. A., Polhemus, M., Remich, S. A., Ockenhouse, C. F., Cohen, J., Ballou, W. R., Martin, S. K., Angov, E., Stewart, V. A., Lyon, J. A., Heppner, D. G., Withers, M. R., MSP-1 Malaria Vaccine Working Group. (2009). Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody

- concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS One*. 4(3), e4708.
206. Oliver, M., Simon, F., de Monbrison, F., Beavogui, A. H., Pradines, B., Ragot, C., Moalic, J. L., Rapp, C., Picot, S. (2008). New use of primaquine for malaria. *Med Mal Infect*, 38(4), 169-79.
 207. Orlandi, P. A., Klotz, F. W., Haynes, J. D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac (alpha 2-3) Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol*, 116(4), 901-9
 208. Osier, F. H., Mackinnon, M. J., Crosnier, C., Fegan, G., Kamuyu, G., Wanaguru, M., Ogada, E., McDade, B., Rayner, J. C., Wright, G. J., Marsh, K. (2014). New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med*, 6(247), 247ra102.
 209. Palacpac, N. M., Arisue, N., Tougan, T., Ishii, K. J., Horii, T. (2011). *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate. *Vaccine*, 29(35), 5837-45
 210. Pandey, K. C., Singh, S., Pattnaik, P., Pillai, C. R., Pillai, U., Lynn, A., Jain, S. K., Chitnis, C. E. (2002). Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. *Mol Biochem Parasitol*, 123(1), 23-33.
 211. Parham, P., Adams, E. J., Arnett, K. L. (1995). The origin of HLA-A,B,C polymorphism. *Immunol Rev*, 143, 141-80.
 212. Pasvol, G., Weatherall, D. J., Wilson, R. J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature*, 274(5672), 701-3.
 213. Patel, S. D., Ahouidi, A. D., Bei, A. K., Dieye, T. N., Mboup, S., Harrison, S. C., Duraisingh, M. T. (2013). *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, PfRH5, elicits detectable levels of invasion-inhibiting antibodies in humans. *J infect Dis*, 208(10), 1679-87.
 214. Pearce, R. J., Pota, H., Evehe, M. S., Bâ, el-H., Mombo-Ngoma, G., Malisa, A. L., Ord R., Inojosa, W., Matondo, A., Diallo, D. A., Mbacham, W., Van den Broek, I. V., Swarthout, T. D., Getachew, A., Dejene, S., Grobusch, M. P., Njie, F., Dunyo, S., Kweku, M., Owusu-Agyei, S., Chandramohan, D., Bonnet, M., Guthmann, J.

- P., Clarke, S., Barnes, K. I., Streat, E., Katokele, S. T., Uusiku, P., Agboghroma, C. O., Elegba, O. Y., Cissé, B., A-Elbasit, I. E., Giha, H. A., Kachur, S. P., Lynch, C., Rwakimari, J. B., Chanda, P., Hawela, M., Sharp, B., Naidoo, I., Roper, C. (2009). Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med*, 6: e1000055.
215. Persson, K. E., McCallum, F. J., Reiling, L., Lister, N. A., Stubbs, J., Cowman, A. F., Marsh, K., Beeson, J. G. (2008). Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest*, 118(1), 342-51.
216. Peterson, D. S., Walliker, D., Wellems, T. E. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), 9114-18.
217. Peterson, D. S., Milhous, W. K., Wellems, T. E. (1990). Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(8), 3018-22.
218. Peterson, D. S., Wellems, T. E. (2000). EBL-1, a putative erythrocyte binding protein of *Plasmodium falciparum*, maps within a favored linkage group in two genetic crosses. *Mol Biochem Parasitol*, 105(1), 105-13.
219. Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A. M., Heppner, D. G., Stewart, V. A., Hasegawa, H., Looareesuwan, S., Shanks, G. D., Miller, R. S. (2004). Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol*, 172(8), 4926-33.
220. Pinder, J. C., Fowler, R. E., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., Lavin, F. M., Mitchell, G. H., Wilson, R. J., Gratzer, W. B. (1998). Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1831-9.
221. Plowe, C. V., Kublin, J. G., and Doumbo, O. K. (1998). *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resist Updat*, 1(6), 389-96.
222. PNLP. (2010). Plan Strategique National 2011-2015.
223. PNLP. (2014). Cadre stratégique de lutte le Paludisme 2014-2018.

224. PNLP. (2015). Plan Strategique National de Lutte contre le Paludisme au Sénégal 2016-2020.
225. PNLP. (2018). Bulletin épidémiologique annuel 2017 du paludisme au Sénégal.
226. Polhemus, M. E., Magill, A. J., Cummings, J. F., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., Lanar, D. E., Dutta, S., Barbosa, A., Soisson, L., Diggs, C. L. Robinson, S. A., Haynes, J. D., Stewart, V. A., Ware, L. A., Brando, C., Krzych, U., Bowden, R. A., Cohen, J. D., Dubois, M. C., Ofori-Anyinam, O., De-Kock, E., Ballou, W. R., Heppner, D. G. Jr. (2007). Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of Plasmodium falciparum apical membrane protein (AMA-1) FMP2. 1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*, 25(21), 4203-12.
227. Pradines, B., Dormoia, J., Briolanta, S., Bogreua, H., Rogier, C. (2010). La résistance aux antipaludiques. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*, 422, 51.
228. Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., Jarra, W. (2000). The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect*, 2(12), 1461-77.
229. Premji, Z., Ndayanga, P., Shiff, C., Minjas, J., Lubega, P., MacLeod, J. (1997). Community based studies on childhood mortality in a malaria holoendemic area on the Tanzanian coast. *Acta Tropica*, 63(2-3), 101-09.
230. Randrianarivelojosa, M., Raherinjafy, R. H., Migliani, R., Mercereau- Puijalon, O., Arie, F., Bedja, S. A. (2004). *Plasmodium falciparum* resistant to chloroquine and to pyrimethamine in Comoros. *Parasite*, 11(4), 419-23.
231. Rayner, J. C., Galinski, M. R., Ingravallo, P., Barnwell, J. W. (2000). Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9648-53.
232. Rayner, J. C., Vargas-Serrato, E., Huber, C. S., Galinski, M. R., Barnwell, J. W. (2001). A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med*, 194(11), 1571-81.

233. Rebaudet, S., Bogreau, H., Silai, R., Lepere, J. F., Bertaux, L., Pradines, B., Delmont J, Gautret P, Parola, P., Rogier, C. (2010). Genetic Structure of *Plasmodium falciparum* and Elimination of Malaria, Comoros Archipelago. *Emerg Infect Dis*, 16, 1686-94.
234. Reddy, K. S., Pandey, A. K., Singh, H., Sahar, T., Emmanuel, A., Chitnis, C. E., Chauhan, V. S., Gaur, D. (2014). Bacterially expressed full-length recombinant *Plasmodium falciparum* RH5 protein binds erythrocytes and elicits potent strain-transcending parasite-neutralizing antibodies. *Infect Immun*, 82(1), 152-64.
235. Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(4), 1179-84.
236. Reed, G. H., Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis, *Clin Chem*, 50(10), 1748-54.
237. Reed, G. H., Kent, J. O., Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.
238. Reeder, J. C., Rieckmann, K. H., Genton, B., Lorry, K., Wines, B., Cowman, A. F. (1996). Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes and *in vitro* susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*, 55(2), 209-13.
239. Reiling, L., Richards, J. S., Fowkes, F. J., Barry, A. E., Triglia, T., Chocejindachai, W., Michon, P., Tavul, L., Siba, P. M., Cowman, A. F., Mueller, I., Beeson, J. G. (2010). Evidence that the erythrocyte invasion ligand PfRh2 is a target of protective immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Immunol*, 185(10), 6157-67.
240. Remarque, E. J, Faber, B. W., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W. (2008). Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol*. 24(2), 74-84.
241. Richards, J. S., Beeson, J. G. (2009). The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol*, 87(5), 377-90.

242. Richards, J. S., Stanisic, D. I., Fowkes, F. J., Tavul, L., Dabod, E., Thompson, J., K., Kumar, S., Chitnis, C. E., Narum, D. L., Michon, P., Siba, P. M., Cowman, A.F., Mueller, I., Beeson, J. G. (2010). Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis*, 51(8), e50-60.
243. Richter, J., Göbels, K. Müller-Stöver, I., Hoppenheit, B., Häussinger, D. (2004). Co reactivity of plasmodial histidine-rich protein 2 and aldolase on a combined immune chromatographic-malaria dipstick (ICT) as a potential semi-quantitative marker of high *Plasmodium falciparum* parasitaemia. *Parasitol Res*, 94(5), 384-5.
244. Rickman, L. S., Long, G. W., Oberst, R., Cabanban, A., Sangalang, R., Smith, J. I., Chulay, J. D., Hoffman, S. L. (1989). Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet*, 1(8629), 68-71.
245. Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., Baum, J. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*, 9(1), 9-20.
246. Rodriguez, M., Lustigman, S., Montero, E., Oksov, Y., Lobo, C. A. (2008). PfrH5: a novel reticulocyte-binding family homolog of *Plasmodium falciparum* that binds to the erythrocyte, and an investigation of its receptor. *PLoS One*, 3(10), e3300.
247. Rogier, C., Orlandi-Pradines, E., Fusaï, T., Pradines, B., Briolant, S., Almeras, L. (2006). Malaria vaccines: prospects and reality. *Med Mal Infect*, 36(8), 414-22.
248. Roggwiler, E., Fricaud, A. C., Blisnick, T., Braun Breton, C. (1997). Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 86(1), 49-59.
249. Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G., Kissinger, J. C., Klimczak, L. J., Striepen, B. (1999). Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol*, 2(4), 426-32.
250. Roper, C., Pearce, R., Bredenkamp, B., Gumede, J., Drakeley, C., Mosha, F., Chandramohan, D., Sharp, B. (2003). Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*, 361(9364), 1174-81.

251. Roper, C., Pearce, R., Nair, S., Sharp, B., Nosten, F., Anderson, T., (2004). Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*, 305(5687), 1124.
252. Rosenthal, P. J. (2015). The RTS,S/AS01 vaccine continues to show modest protection against malaria in African infants and children. *Evid Based Med*, 20(5), 179.
253. Rutledge, L. C., Gould, D. J., Tantichareon, B. (1969). Factors affecting the infection of anophelines with human malaria in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 63(5), 613-9.
254. Sabbatani, S., Fiorino, S., Manfredi, R. (2010). The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz J Infect Dis*, 14(2), 299-309.
255. Salgueiro, P., Vicente J. L., Ferreira, C., Teófilo, V., Galvão, A., Rosário, V. E do., Cravo, P., Pinto, J. (2010). Tracing the origins and signatures of selection of antifolate resistance in island populations of *Plasmodium falciparum*. *BMC Infect Dis*; 10: 163.
256. Sagara, I., Dicko, A., Ellis, R. D., Fay, M. P., Diawara, S. I., Assadou, M. H., Sissoko, M. S., Kone, M., Diallo, A. I., Saye, R., Guindo, M. A., Kante, O., Niambele, M. B., Miura, K., Mullen, G. E., Pierce, M., Martin, L. B., Dolo, A., Diallo, D. A., Doumbo, O. K., Miller, L. H., Saul, A. (2009). A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine*, 27(23), 3090-8.
257. Sahar, T., Reddy, K. S., Bharadwaj, M., Pandey, A. K., Singh, S., Chitnis, C. E., Gaur, D. (2011). *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding-like homologue protein 2 (PfRH2) is a key adhesive molecule involved in erythrocyte invasion. *PLoS One*, 6(2), e17102.
258. Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today*, 12(8), 308-16.
259. Sanders, P. R., Gilson, P. R., Cantin, G. T., Greenbaum, D. C., Nebl, T., Carucci, D. J., McConville, M. J., Schofield, L., Hodder, A. N., Yates, J. R. 3rd., Crabb, B. S. (2005). Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 280(48), 40169-76.
260. Schofield, L., Bushell, G. R., Cooper, J. A., Saul, A. I., Upcroft, J. A., Kidson, C. (1986). A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognized by inhibitory monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*. 18(2), 183-95.

261. Sheehy, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Choudhary, P., Biswas, S., Anagnostou, N. A., Collins, K. A., Edwards, N. J., Douglas, A. D., Anagnostou, N. A., Ewer, K. J., Havelock, T., Mahungu, T., Bliss, C. M., Miura, K., Poulton, I. D., Lillie, P. J., Antrobus, R. D., Berrie, E., Moyle, S., Gantlett, K., Colloca, S., Cortese, R., Long, C. A., Sinden, R. E., Gilbert, S. C., Lawrie, A. M., Doherty, T., Faust, S. N., Nicosia, A., Hill, A. V., Draper, S. J. (2012). ChAd63-MVA-vectored blood-stage malaria vaccines targeting MSP1 and AMA1: assessment of efficacy against mosquito bite challenge in humans. *Mol Ther*, 20(12), 2355-68.
262. Shulman, C. E., Dorman, E. K., Cutts, F., Kawuondo, K., Bulmer, J. N., Peshu, N., March, K. (1999). Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 353(9153), 632-6.
263. Sibley, C. H., Hyde, J. E., Sims, P. F., Plowe, C. V., Kublin, J. G., Mberu, E. K., Cowman, A. F., Winstanley, P. A., Watkins, W. M., Nzila, A. M. (2001). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*, 17(12), 582-8
264. Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J., Miller, L. H. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science*, 264(5167), 1941-4.
265. Sinden, R. E., and Billingsley, P. F. (2001). *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol*, 17(5), 209-12.
266. Singh, N., Singh, M. P., Sharma, V. P. (1997). The use of a dipstick antigen-capture assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in a remote forested area of central India. *Am J Trop Med Hyg*, 56(2), 188-91.
267. Smith, T. G., Lourenco, P., Carter, R., Walliker, D., Ranford-Cartwright, L. C. (2000). Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 121(Pt 2), 127-33.
268. Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., Chitnis, C. E. (2010). Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *PLoS Pathog*, 6(2), e1000746.
269. Sirima, S. B., Cousens, S., Druilhe, P. (2011). Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *N Engl J Med*, 365(11), 1062-4.

270. Smythe, J. A., Peterson, M. G., Coppel, R. L., Saul, A. J., Kemp, D. T., Anders, R. F. (1990). Structural diversity in the 45 kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 39(2), 227-34.
271. Snounou, G., Zhu, X., Siripoon, N., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K. N., Virivakosol, S. (1993). Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93(4), 369-74.
272. Spadafora, C., Awandare, G. A., Kopydlowski, K. M., Czege, J., Moch, J. K., Finberg, R. W., Tsokos, G. C., Stoute, J. A. (2010). Complement receptor 1 is a sialic acid-independent erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000968.
273. Spencer, H. C., Collins, W. E., Skinner, J. C. (1979). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. II. Comparison with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA). *Am J Trop Med Hyg*, 28(6), 933-6.
274. Srinivasan P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., Tyler, J. S., Narum, D. L., Pierce, S. K., Boothroyd, J. C., Haynes, J. D, Miller, L. H. 2011. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), 13275-80.
275. Stephens, J. W. W. (1922). A new malaria parasite of man. *Ann Trop Med Parasitol*, 16(4), 383-8.
276. Stevenson, M. M., and Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*, 4, 169-80.
277. Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., Desmons, P., Wellde, B. T., Garcon, N., Krzych, U., Marchand, M. (1997). A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*, 336(2), 86-91.
278. Stubbs, J., Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Winzeler, E. A., Cowman, A. F. (2005). Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*, 309(5739), 1384-7.
279. Su, X., Wellems, T. E. (1996). Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*, 33(3), 430-44.

280. Swarthout, T. D., Counihan, H., Senga, R. K., van den Broek, I., 2007. Paracheck-Pf accuracy and recently treated *Plasmodium falciparum* infections: is there a risk of over-diagnosis? *Malar J*, 6, 58.
281. Takala, S. L., Escalante, A. A., Branch, O. H., Kariuki, S., Biswas, S., Chaiyaroj, S. C., Lal, A. A. (2006). Genetic diversity in the Block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. *Infect Genet Evol*, 6(5), 417-24.
282. Talisuna, A. O., Nalunkuma-Kazibwe, A., Langi, P., Mutabingwa, T. K., Watkins, W. W., Marck, E. V., Egwang, T. G., D'Alessandro, U. (2004). Two mutations in dihydrofolate reductase combined with one in the dihydropteroate synthase gene predict sulphadoxine-pyrimethamine parasitological failure in Uganda children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Infect Genet Evol*, 4(4), 321-7.
283. Tall, A. I., Rabarijaona, L. P., Robert, V., Bedja, S. A., Ariey, F., Randrianarivelojosia, M. (2007). Efficacy of artesunate plus amodiaquine, artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine, and chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* in the Comoros Union. *Acta Trop*, 102(3), 176-81.
284. Tamminga, C., Sedegah, M., Maiolatesi, S., Fedders, C., Reyes, S., Reyes, A., Vasquez, C., Alcorta, Y., Chuang, I., Spring, M., Kavanaugh, M., Ganeshan, H., Huang, J., Belmonte, M., Abot, E., Belmonte, A., Banania, J., Farooq, F., Murphy, J., Komisar, J., Richie, N.O., Bennett, J., Limbach, K., Patterson, N.B, Bruder, J.T., Shi, M., Miller, E., Dutta, S., Diggs, C., Soisson, L. A., Hollingdale, M. R., Epstein, J. E., Richie, T. L. (2013). Human adenovirus 5-vectored *Plasmodium falciparum* NMRC-M3V-Ad-PfCA vaccine encoding CSP and AMA1 is safe, well-tolerated and immunogenic but does not protect against controlled human malaria infection. *Hum Vaccin Immunother*, 9(10), 2165-77.
285. Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., Scaife, J. G. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*, 195(2), 273-87.
286. Tanomsing, N., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Looareesuwan, S., Mayxay, M., Dolecek, C., Hien, T. T., do Rosario, V. E., Arez, A. P., Michon, P., Snounou, G., White, N. J., Day, N. P. (2007). Genetic analysis of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from geographically diverse isolates of *Plasmodium malariae*, *Antimicrob Agents Chemother*, 51(10), 3523-30.

287. Taylor, H. M., Triglia, T., Thompson, J., Sajid, M., Fowler, R., Wickham, M. E., Cowman, A. F., Holder, A. A. (2001). Plasmodium falciparum homologue of the genes for Plasmodium vivax and Plasmodium yoelii adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infect Immun*, 69(6), 3635-45.
288. Taylor, H. M., Grainger, M., Holder, A. A. (2002). Variation in the expression of a Plasmodium falciparum protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infect Immun*, 70(10), 5779-89.
289. Tham, W. H., Healer, J., Cowman, A. F. (2012). Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol*, 28(1), 23–30.
290. Tham, W. H., Lim, N. T., Weiss, G. E., Lopaticki, S., Ansell, B. R., Bird, M., Lucet, I., Dorin-Semlat, D., Doerig, C., Gilson, P.R., Crabb, B. S., Cowman, A. F. (2015). Plasmodium falciparum Adhesins Play an Essential Role in Signalling and Activation of Invasion into Human Erythrocytes. *PLoS Pathog*, 11(12), e1005343.
291. The RTS,S Clinical Trials Partnership. (2014). Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLoS Med*, 11(7), e1001685.
292. Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H., Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by Plasmodium knowlesi. *Infect Immun*, 57(10), 3230-3.
293. Touray, M. G., Warburg, A., Laughinghouse, A., Krettli, A. U., Miller, L. H. (1992). Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. *J Exp Med*, 175(6), 1607-12.
294. Traore, K., Lavoignat, A., Bonnot, G., Sow, F., Bess, G. C., Chavant, M., Gay, F., Doumbo, O., Picot, S. (2015). Drying anti-malarial drugs *in vitro* tests to outsource SYBR green assays. *Malar J*, 14, 90.
295. Treeck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., Gilberger, T. W. (2009). Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. *PLoS Pathog*, 5(3), e1000322.
296. Triglia, T., Cowman, A. F. (1994). Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15), 7149-53.

297. Triglia, T., Thompson, J., Caruana, S. R., Delorenzi, M., Speed, T., Cowman, A. F. (2001). Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to reticulocyte binding proteins in *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*, 69(2), 1084-92.
298. Triglia, T., Chen, L., Lopaticki, S., Dekiwadia, C., Riglar, D. T., Hodder, A. N., Ralph, S. A., Baum, J., Cowman, A. F. (2011). *Plasmodium falciparum* merozoite invasion is inhibited by antibodies that target the PfRh2a and b binding domains. *PLoS Pathog*, 7(6), e1002075.
299. Triglia, T., Duraisingh, M. T., Good, R. T., Cowman, A. F. (2005). Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 55(1), 162-74.
300. Van den Eede, P., Van, H. N., Van Overmeir, C., Vythilingam, I., Duc, T. N., Hung le, X., Manh, H. N., Anne, J., D'Alessandro, U., Erhart, A. (2009). Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J*, 8, 249.
301. Van Wye, J., Ghori, N., Webster, P., Mitschler, R. R., Elmendorf, H. G., Haldar, K. (1996). Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 83(1), 107-20.
302. Veron, V., Carne, B. (2006). Recovery and use of *Plasmodium* DNA from malaria rapid diagnostic tests. *Am J Trop Med Hyg*, 74(6), 941-3.
303. Volkman, S. K., Sabeti, P. C., DeCaprio, D., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Milner, D. A., Jr, Daily, J. P., Sarr, O., Ndiaye, D. Ndir, O., Mboup, S., Duraisingh, M. T., Lukens, A., Derr, A., Stange-Thomann, N., Waggoner, S., Onofrio, R., Ziaugra, L., Mauceli, E., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Zainoun, J., Wiegand, R. C., Birren, B. W., Hartl, D. L., Galagan, J. E., Lander, E. S., Wirth, D. F. (2007). A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*, 39(1), 113-19.
304. Volkman, S. K., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Park, D. J., Wirth, D. F. (2012). Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nat Rev Genet*, 13(5), 315-28.
305. Walliker, D., Quakyi, I. A., Wellems, T. E., McCutchan, T. F., Szarfman, A., London, W. T., Corcoran, L. M., Burkot, T. R., Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 236(4809), 1661-6.
306. Wanaguru, M., Liu, W., Hahn, B. H., Rayner, J. C., Wright, G. J. (2013). RH5-Basigin interaction plays a major role in the host tropism of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20735-40.

307. Wang, P., Read, M., Sims, P. F., Hyde, J. E. (1997). Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*, 23(5), 979-86.
308. Wardlaw, S. C., Levine, R. A. (1983). Quantitative Buffy Coat analysis, a new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *JAMA*, 249(5), 617-20.
309. Warhurst, D. C. (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, 344, 299-302.
310. Warhurst, D. C. (2002). Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. *Sci Prog*, 85(Pt 1), 89-111.
311. Warsame, M., Wernsdorfer, W. H., Payne, D., Bjorkman, A. (2001). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* *in vitro* to chloroquine mefloquine, quinine and sulfadoxine/pyrimethamine in Somalia: relationships between the responses to the different drugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(5), 565-9.
312. Warren, M., Collins, W. E., Skinner, J. C., Larin, A. J. (1975). The seroepidemiology of malaria in Middle America. I. Longitudinal studies on populations in a low incidence area of El Salvador. *Am J Trop Med Hyg*, 24(5), 740-8.
313. Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W. H., de Jong, N. W., Harvey, K. L., Fowkes, F. J., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., Crabb, B. S. (2015). Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004670.
314. White, N. J. (2004). Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 113(8), 1084-92
315. White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*, 46(2), 172-3.
316. Whitty, C. J., Jaffar, S. (2002). *Plasmodium falciparum* cross resistance. *Lancet*, 359(9300), 80.
317. Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H., Meshnick, S. R. (2002). Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*, 2(4), 209-18.
318. World Health Organization. (1961). The work of WHO, 1961: annual report of the Director-General to the World Health Assembly and to the United Nations covering the period 1 October--31 December 1961. World Health Organization. 194p.

319. World Health Organisation. (2004). World Malaria Report. Geneva: World Health Organisation. 2004.
320. World Health Organisation. (2009). Report of the Technical Consultation on Intermittent Preventive Treatment in Infants (IPTi), Technical Expert Group on Preventive Chemotherapy. Geneva: World Health Organisation: 1-11.
321. World Health Organisation. (2012). World Malaria Report. Geneva: World Health Organisation. 2012.
322. World Malaria Report. (2012). Prevention and control of malaria epidemics. 3rd meeting of the Technical Support Network. Geneva: World Health Organisation. 2012.
323. World Malaria Report. (2015). World Malaria Report. Geneva, World Health Organisation. 2015.
324. World Malaria Report. (2019). Geneva: World Health Organization. 2018.
325. Wurtz, N., Fall, B., Pascual, A., Diawara, S., Sow, K., Baret, E., Diatta, B., Fall, K. B., Mbaye, P. S., Fall, F., Diémé, Y., Rogier, C., Bercion, R., Briolant, S., Wade, B., Pradines, B. (2012). Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J*, 11, 197.
326. Yuvaniyama, J., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., Vanichtanankul, J., Sirawaraporn, W., Taylor, P., Walkinshaw, M. D., Yuthavong, Y. (2003). Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nat Struct Biol*, 10(5), 357-65.
327. Zhou, L., Wang, L., Palais, R., Pryor, R., Wittwer, C. T. (2005). High-Resolution DNA Melting Analysis for Simultaneous Mutation Scanning and Genotyping in Solution. *Clin Chem*, 51(10), 1770-7.
328. Zuccala, E. S., Gout, A. M., Dekiwadia, C., Marapana, D. S., Angrisano, F., Turnbull, L., Riglar, D. T., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Ralph, S. A., Speed, T. P., Baum, J. (2012). Subcompartmentalisation of Proteins in the Rhoptries Correlates with Ordered Events of Erythrocyte Invasion by the Blood Stage Malaria Parasite. *PLoS One*, 7(9), e46160.

ANNEXES

Annexe : Valorisation des travaux de thèse

 **Article publié dans Malaria Journal**

[Annexe 1]:

High resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr*

and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations

Cyrille K. Diédhiou^{2†}, Yaye Dié Ndiaye^{1,5*†}, Amy K. Bei^{1,2,3,5,6}, Baba Dieye^{1,5}, Aminata Mbaye¹, Nasserline Papa Mze², Rachel F. Daniels^{6,8}, Ibrahima M. Ndiaye¹, Awa B. Déme^{1,5}, Amy Gaye¹, Mouhamad Sy¹, Tolla Ndiaye¹, Aida S. Badiane^{1,5}, Mouhamadou Ndiaye^{1,5}, Zul Premji^{3,7}, Dyann F. Wirth^{6,8}, Souleymane Mboup², Donald Krogstad^{4,5}, Sarah K. Volkman^{5,6,8,9}, Ambroise D. Ahouidi^{2,5†} and Daouda Ndiaye^{1,5†}

 **Article publié dans Malaria Journal**

[Annexe 2]:

RDTs as a source of DNA to study *Plasmodium falciparum* drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands

Nasserline Papa Mze^{1*}, Yaye Die Ndiaye², **Cyrille K. Diedhiou¹**, Silai Rahamatou³, Baba Dieye², Rachel F. Daniels⁴, Elizabeth J. Hamilton⁵, Mouhamadou Diallo¹, Amy K. Bei^{1,4}, Dyann F. Wirth^{4,6}, Souleymane Mboup¹, Sarah K. Volkman^{4,6,7}, Ambroise D. Ahouidi^{1†} and Daouda Ndiaye^{2†}

 **Article publié dans Malaria Journal**

[Annexe 3]:

Temporal change in *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 2b (*PfRh2b*) in Senegal and The Gambia

Cyrille K. Diédhiou^{1,2†}, Rahama A. Moussa², Amy K. Bei^{2,3,4}, Rachel Daniels³, Nasserline Papa Mze^{1,2}, Daouda Ndiaye⁴, Ngor Faye⁵, Dyann Wirth³, Alfred Amambua-Ngwa⁶, Souleymane Mboup¹, Ambroise D. Ahouidi^{1,2}

RESEARCH

Open Access



High resolution melting: a useful field-deployable method to measure *dhfr* and *dhps* drug resistance in both highly and lowly endemic *Plasmodium* populations

Yaye Dié Ndiaye^{1,5†}, Cyrille K. Diédhiou^{2†}, Amy K. Bei^{3,2,3,5,6}, Baba Diéye^{1,5}, Aminata Mbaye¹, Nasseridine Papa Mze², Rachel F. Daniels^{6,8}, Ibrahima M. Ndiaye¹, Awa B. Déme^{1,5}, Amy Gaye¹, Mouhamad Sy¹, Tolla Ndiaye¹, Aida S. Badiane^{1,5}, Mouhamadou Ndiaye^{1,5}, Zul Premji^{3,7}, Dyann F. Wirth^{6,8}, Souleymane Mboup², Donald Krogstad^{4,5}, Sarah K. Volkman^{5,6,8,9}, Ambroise D. Ahouidi^{2,5†} and Daouda Ndiaye^{1,5†}

Abstract

Background: Emergence and spread of drug resistance to every anti-malarial used to date, creates an urgent need for development of sensitive, specific and field-deployable molecular tools for detection and surveillance of validated drug resistance markers. Such tools would allow early detection of mutations in resistance loci. The aim of this study was to compare common population signatures and drug resistance marker frequencies between two populations with different levels of malaria endemicity and history of anti-malarial drug use: Tanzania and Sénégal. This was accomplished by implementing a high resolution melting assay to study molecular markers of drug resistance as compared to polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) methodology.

Methods: Fifty blood samples were collected each from a lowly malaria endemic site (Sénégal), and a highly malaria endemic site (Tanzania) from patients presenting with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria at clinic. Data representing the DHFR were derived using both PCR–RFLP and HRM assay; while genotyping data representing the DHPS were evaluated in Senegal and Tanzania using HRM. Msp genotyping analysis was used to characterize the multiplicity of infection in both countries.

Results: A high prevalence of samples harbouring mutant DHFR alleles was observed in both population using both genotyping techniques. HRM was better able to detect mixed alleles compared to PCR/RFLP for DHFR, codon 51 in Tanzania; and only HRM was able to detect mixed infections from Senegal. A high prevalence of mutant alleles in DHFR (codons 51, 59, 108) and DHPS (codon 437) were found among samples from Sénégal while no mutations were observed at DHPS codons 540 and 581, from both countries. Overall, the frequency of samples harbouring either a single DHFR mutation (S108N) or double mutation in DHFR (C59R/S108N) was greater in Sénégal compared to Tanzania.

*Correspondence: yndiaye@gmail.com

[†]Yaye Dié Ndiaye, Cyrille K. Diédhiou, Ambroise D. Ahouidi and Daouda Ndiaye contributed equally to this work

¹Laboratory of Parasitology Mycology, Aristide Le Dantec Hospital, Faculty of Medicine and Pharmacy, Cheikh Anta Diop University, 5005 Dakar, Senegal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Conclusion: Here the results demonstrate that HRM is a rapid, sensitive, and field-deployable alternative technique to PCR-RFLP genotyping that is useful in populations harbouring more than one parasite genome (polygenomic infections). In this study, a high levels of resistance polymorphisms was observed in both *dhfr* and *dhps*, among samples from Tanzania and Senegal. A routine monitoring by molecular markers can be a way to detect emergence of resistance involving a change in the treatment policy.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *dhfr*, *dhps*, HRM, PCR/RFLP, Senegal, Tanzania

Background

Plasmodium falciparum, the most deadly species of *Plasmodium* parasites that infect humans, remains a public health problem with the majority of cases and deaths occurring in sub-Saharan Africa [1]. Anti-malarial drug resistance is a major public health problem that hinders the control of malaria. *P. falciparum* resistance has been observed for all anti-malarial drugs used to date, including the artemisinin derivatives, where resistance has emerged in Asia [2–4]. Continuous monitoring of the effectiveness of anti-malarial drugs both in vivo and in vitro plays a critical role in guiding treatment policy. Monitoring molecular markers of resistance is a quick and effective way to identify changes in drug resistance in real time. Malaria remains an important public health issue generally in Africa, and specifically in Senegal and Tanzania, causing significant morbidity and mortality in infants and pregnant women [2]. In Senegal, the epidemiological profile is characterized by a stable endemic malaria, marked by a seasonal increase, with parasite prevalence trends having declined overall from 5.9% in 2008 to 1.2% in 2014 [5]. However, malaria incidence remains elevated, especially in parts of the country where deaths attributable to malaria persist [6]. In contrast, malaria transmission in Mlandizi, Tanzania is perennial [7], with a high burden of malaria infection and clinical disease as indicated by the 678,207 reported cases of malaria in 2014 that resulted in 5368 deaths from malaria [2].

Chloroquine (CQ) was the treatment of choice against the uncomplicated malaria in both Tanzania and Senegal for decades. However, rising rates of CQ resistance led Tanzania to change its first-line treatment from CQ to sulfadoxine-pyrimethamine (SP) in 2001 and then to artemisinin-based combination therapy (ACT) in 2006 [8]. Senegal changed from CQ to SP-amodiaquine (AQ) in 2003 for use in seasonal malaria chemoprevention defined as the intermittent administration of full treatment courses of an anti-malarial medicine to children during the malaria season in areas of highly seasonal transmission (SMC) and then to ACT as first-line treatment of uncomplicated *P. falciparum* in 2006. SP remains in use for intermittent pregnancy treatment (IPT) in both countries [9–12].

SP is a combination of two antifolate compounds sulfadoxine that inhibits dihydropteroate synthetase (DHPS) and pyrimethamine that targets dihydrofolate reductase (DHFR). This combination acts synergistically against *P. falciparum*, and SP resistance mutations have been well documented. Mutations resulting in the following amino acid changes N51I, C59R, S108N and I164L have been identified in the *dhfr* gene associated with resistance to pyrimethamine [13–19]. Mutations resulting in the following amino acid changes S436A, A437G, K540E and A613T/S in the *dhps* locus have similarly been linked to sulfadoxine resistance [20–25]. Despite high levels of resistance to SP in many countries, this drug combination is still widely used for treatment of uncomplicated malaria, for preventing malaria in pregnant women in the context of IPT [2, 26], or in combination with artemisinin derivatives for SMC as recommended by the World Health Organization (WHO). Routine monitoring of genetic resistance mutations affecting SP efficacy is useful in determining whether the drugs should continue to be used for treatment of uncomplicated malaria or malaria pregnancy.

Different methods have been developed to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and specific phenotypes. Polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Taqman real-time PCR with allele-specific probes, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) are the most commonly used techniques that are suitable for these types of studies [27, 28]. PCR/RFLP is time consuming and needs specific restriction enzymes for each SNP, as well as the ability to resolve and visualize the products using gel electrophoresis. DGGE requires extensive expertise that is not always available in disease endemic settings. Furthermore, the Taqman fluorescent probes are expensive and reagents expire rapidly. High-resolution melting (HRM) analysis is a post-PCR analysis method designed to investigate variance in nucleic acid sequences [29]. Many studies have already published the accuracy, specificity and sensitivity of this technique, and its ability to detect minor alleles [30–32], and identify new genetic variants that can be confirmed by sequencing [29, 31]. HRM is a powerful analysis tool for large-scale genotyping as it is rapid, low cost and easy to deploy in the field.

The goals of this study was to: (1) compare the results of HRM to those using PCR-RFLP in the context of drug resistance marker surveillance in a malaria endemic country; and, (2) to determine the prevalence of mutations N51I, C59R, S108N in the *dhfr* gene and A437G, K540E, A581G, A613T/S in the *dhps* gene, across two malaria endemic settings with distinct frequencies of polyclonal infections (infections harbouring more than 1 parasite genome), as determined by MSP 1 and 2 genotyping.

Methods

Study population

This study was conducted using samples from two African countries: Sénégal and Tanzania, with distinct malaria endemicity profiles. Samples from Senegal were collected in Thiès, an urban area located 70 km from capital city of Dakar, at the Service de Lutte Antiparasitaire (SLAP) clinic. In this region, malaria is hypoendemic with average of 0–20 infective bites per person per year ($0 < \text{EIR} < 20$) [33].

Samples from Tanzania, were collected from the Mlandizi Health Centre in the Kibaha coastal region 40 km north-west of Dar es Salaam. In this area, malaria transmission is perennial, with peaks incidence occurring toward the end of the long (May–July) and short (December–January) rains [7, 34]. Individuals seeking treatment for uncomplicated *P. falciparum* malaria at the SLAP clinic in Thies in 2011 and the Mlandizi Health Centre in 2003–2004 were tested for malaria infection by microscopy. Patients between the ages of two and twenty who presented with only *P. falciparum* confirmed by positive blood slide were offered enrollment into this study.

These studies were approved by the Tanzanian Commission for Science and Technology (Permit No. 2003-207-CC-2003-102) together the Ethics Committee of the Ministry of Health in Sénégal (0127MSAS/DPRS/CNRES). Ethical review and approval was then provided by both the Harvard T.H. Chan School of Public Health Human Subjects Committee (P11778-101), and the Human Subjects Committee of Tulane University, New Orleans.

Sample collection

After informed consent, blood samples from finger-pricks were collected and stored on Whatman FTA filter papers prior to treatment with SP in Tanzania (2003) and ACT (artemether–lumefantrine) in Sénégal (2011), according to the directives of the WHO and Ministry of Health in both countries, at the time of collection. Fifty samples from each country were randomly selected for DNA extraction and further genetic analyses.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from filter paper using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) method. The extraction protocol for filter paper samples was performed and all samples were processed in the same way. Extracted DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until tested by PCR-RFLP and HRM.

Genotyping methods

Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Sample analysis was based on the standardized polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism method, as previously described [35]. After PCR amplification, 0.5 unit of site specific restriction enzymes were used to digest the PCR amplicons overnight as described previously by Jelinek et al. [35]. Positive (3D7 and Dd2) and negative non-template controls were included in all amplification and restriction digest procedures.

High resolution melting (HRM)

The reaction was performed on a LightScanner-32 carousel platform using primers and probes as previously described [29]. Glass capillaries were used with a 10 μl final volume. Combining both mutant allele amplification bias (MAAB) [29] and glass capillaries are ideal for measuring low minor allele frequencies (0.01%) in mixed genomic samples, which was one of the goals of this analysis. All PCR reactions were performed using 2.5 \times LightScanner master mix (Biofire), with forward primers at a final concentration of 0.05 μM , reverse primers at a final concentration of 0.2 μM (asymmetric PCR), and allele specific probes at a final concentration of 0.2 μM , and 1 μl of genomic DNA, as previously described [29]. Standard software included with the instruments was used for unlabeled probe analysis to visualize melting peaks based on different melting temperatures, indicative of different base pairs, and compared with controls to call alleles for a given assay.

msp genotyping

Block 2 of *msp1* [36] and block 3 of *msp2* [37] were amplified by nested PCR. The sequence of the primers and the protocol of PCR are described in detail by Snounou et al. [38]. Briefly, PCR was carried out in a total volume of 20 μl that contained 6 μl Gotaq (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl_2 and reaction buffer (pH 8.5), 0.05 μM of each primer and 11 μl of reagent grade water. For the first round of amplification, 1 μl of genomic DNA was added as a template and for the second round 1 μl of the PCR product from the first round was added. Reference strain 3D7 (*msp1*-K1 and *msp2*-1C); Dd2 (*msp1*-MAD20 and

msp2-FC) and 7G8 (*msp1*-RO) were used as positive controls. Reagent grade water was used as negative control. Products were analysed based on size differences on a 2% agarose gel. The multiplicity of infection (MOI) was defined as the greater number of alleles for either *msp1* or *msp2* from a single sample.

The number of patients with more than one amplified PCR fragment within the total population is defined as the frequency of polyclonal infections. The parasite genome number was also estimated to approximate the number of distinct genotypes present in each sample. Thus, *msp* genotyping data were used to estimate genotypes per patient and after that the prevalence of each allele was determined in both countries. However, if the patient presents with a mixed infection with 4 clones, the result was called 'undetermined' since it could be 1 wild-type (WT) and 3 mutant (Mut); 2 WT and 2 Mut; or, 3 WT and 1 Mut.

Statistical analysis

Analysis data was performed using Epi Info7. Fischer's exact test was used to determine the concordance between PCR-RFLP and HRM and the z-test for two population proportions was used to compare the allele prevalence in each country. The Mann-Whitney U test was used to compare the MOI in the sample populations of each country. The test is significant if the p value is less than 0.05.

Results

Comparison to PCR/RFLP and HRM

Data from the *dhfr* gene corresponding to codons 51, 59 and 108 were used to compare the concordance between the PCR/RFLP and HRM assays. Previous studies have specifically compared the sensitivity and accuracy of this HRM method to the gold-standard of sequencing amplicons, and have found HRM results to

be 100% correspondent [29]. However, here the goal was to assess concordance and sensitivity, in situations in which discrepancies were observed in the concordance, the method in which more alleles was detected was considered to be more sensitive. A total of 100 samples: 50 samples from Senegal and 50 from Tanzania were genotyped using both techniques. Senegal and Tanzania were selected for the comparison as the two countries have different frequencies of mixed infections and potentially different minor alleles and frequencies. Both techniques were performed in a laboratory in a malaria-endemic country (Senegal) to assess their performance. In this study, a high prevalence of mutant alleles was observed at codons 51, 59 and 108, with some notable differences.

In Senegal, a high proportion of monoallelic infections was detected using both PCR/RFLP and HRM methods, but only HRM detected a low level of mixed allelic infections. In Tanzania, a country with more polygenomic infections, HRM was better able to detect the mixed alleles among samples, and the frequency of mixed allelic infections detected by HRM were higher than those obtained by PCR/RFLP at codon 51 ($p = 0.005$) and 59 in Tanzania (Table 1).

Prevalence of mutations in Senegal and Tanzania in *dhfr/dhps* genes by HRM

Mutation analysis was successful at each codon analysed from the *dhfr* and *dhps* genes, that included the three codons (N51I, C59R and S108N) in *dhfr* and four codons (A437G, K540E, A581G and A613T/S) in *dhps*. The prevalence of mutations at each codon in monogenomic, polygenomic, and combined infections (as defined by MSP-typing) is shown in Table 2.

In this study, mutant alleles at codons A581G and K540E in *dhps* gene were not found in among the samples analysed from Tanzania and Senegal, and all samples tested carried the wild type alleles A581 and K540, respectively.

Table 1 Percent prevalence of *dhfr* alleles at codons 51, 59 and 108 from isolates collected in Senegal and Tanzania using nested polymerase chain reaction/restriction fragment length polymerase (PCR/RFLP) and high resolution melting (HRM)

		Senegal (N: 50)			Tanzania (N: 50)		
		PCR/RFLP	HRM	p value	PCR/RFLP	HRM	p value
DHFR 51	N51	1/50 (2%)	0	1	09/50 (18%)	08/50 (16%)	1
	S1I	49/50 (98%)	47/50 (94%)	0.6173	37/50 (74%)	26/50 (52%)	0.0365
	N51 + S1I	0	3/50 (6%)	0.2424	04/50 (8%)	16/50 (32%)	0.005
DHFR 59	C59	2/50 (4%)	1/50 (2%)	1	19/50 (38%)	12/50 (24%)	0.1941
	59R	48/50 (96%)	46/50 (92%)	0.6777	24/50 (48%)	22/50 (44%)	0.8411
	C59 + 59R	0	3/50 (6%)	0.3424	07/50 (14%)	16/50 (32%)	0.0558
DHFR 108	S108	3/50 (6%)	0	0.4949	07/50 (14%)	07/50 (14%)	1
	I08N	48/50 (96%)	49/50 (98%)	1	35/50 (70%)	38/50 (76%)	0.6528
	S108 + I08N	0	1/50 (2%)	1	08/50 (16%)	09/50 (18%)	0.5535

N total number of patient

Table 2 Prevalence of mutations in *dhfr* and *dhps* in Senegal and Tanzania: monogenomic, polygenomic, and combined

Genes	Alleles	Monogenomic infections			Polygenomic infections			Combined prevalence of mutations		
		Senegal	Tanzania	p value	Senegal	Tanzania	p value	Senegal	Tanzania	p value
DHPS 437	A437	10/23 (43.47%)	6/14 (42.86%)	0.9681	8/27 (29.62%)	12/36 (33.33%)	0.75656	18/50 (36%)	18/50 (36%)	1
	G437	12/23 (52.17%)	6/14 (42.86%)	0.58	16/27 (59.25%)	11/36 (30.56%)	0.0226	28/50 (56%)	17/50 (34%)	0.0271
DHPS 540	A437 + G437	1/23 (4.34%)	2/14 (14.29%)	0.28	3/27 (11.11%)	13/36 (36.11%)	0.02382	4/50 (8%)	15/50 (30%)	0.00512
	K540	23/23 (100%)	14/14 (100%)	≥0.05	27/27 (100%)	36/36 (100%)	≥0.05	50/50 (100%)	50/50 (100%)	≥0.05
DHPS 581	E540	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0.05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0.05	0	0	≥0.05
	K540 + E540	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0.05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0.05	0	0	≥0.05
DHFR 51	A581	29/23 (100%)	14/14 (100%)	≥0.05	27/27 (100%)	36/36 (100%)	≥0.05	50/50 (100%)	50/50 (100%)	≥0.05
	G581	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0.05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0.05	0	0	≥0.05
DHFR 613	A581 + G581	0/23 (0%)	0/14 (0%)	≥0.05	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0.05	0	0	≥0.05
	A613	21/23 (91.30%)	14/14 (100%)	0.25848	26/27 (96.29%)	36/36 (100%)	≥0.05	46/50 (92%)	49/50 (98%)	0.16758
DHFR 51	T5613	1/23 (3.33%)	0/14 (0%)	0.42952	0/27 (0%)	0/36 (0%)	≥0.05	2/50 (4%)	0	0.15272
	A613 + T5613	1/23 (3.33%)	0/14 (0%)	0.42952	1/27 (3.7%)	0/36 (0%)	0.24604	2/50 (4%)	1/50 (2%)	0.5552
DHFR 51	N51	0/23 (0%)	4/14 (28.57%)	0.00672	0/27 (0%)	4/36 (11.12%)	0.07346	0	09/50 (18%)	0.00168
	511	20/23 (86.95%)	4/14 (28.57%)	0.0003	0/27 (0%)	22/36 (61.12%)	0.00024	47/50 (94%)	37/50 (74%)	0.00634
DHFR 59	N51 + 511	3/23 (13.04%)	6/14 (42.86%)	0.04036	2/27 (100%)	10/36 (27.78%)	0.00278	3/50 (6%)	04/50 (8%)	0.66654
	C59	0/23 (0%)	4/14 (28.57%)	0.00672	0/27 (0%)	8/36 (22.22%)	0.03752	1/50 (2%)	19/50 (38%)	0
DHFR 59	59R	20/23 (86.95%)	4/14 (28.57%)	0.0003	17/27 (62.96%)	18/36 (50%)	0.0001	46/50 (92%)	24/50 (48%)	0
	C59 + 59R	3/23 (13.04%)	6/14 (42.86%)	0.04036	0/27 (0%)	10/36 (27.78%)	0.0088	3/50 (6%)	07/50 (14%)	0.18352
DHFR 108	5108	0/23 (0%)	5/14 (35.71%)	0.00208	0/27 (0%)	2/36 (5.55%)	0.21498	0	07/50 (14%)	0.00614
	N108	22/23 (95.65%)	9/14 (64.29%)	0.01208	27/27 (100%)	29/36 (80.56%)	0.0151	49/50 (98%)	35/50 (70%)	0.00014
DHFR 108	5108 + N108	1/23 (4.35%)	0/14 (0%)	0.42952	0/27 (0%)	3/36 (8.33%)	0.04338	1/50 (2%)	08/50 (16%)	0.01428

Msp-1 and Msp-2 typing data were combined with drug resistance allele typing to determine the prevalence of mutations at each codon in monogenomic, polygenomic. The z-test for 2 population proportions was used to compare the allele prevalence in each country. The test is significant if the p value is less than 0.05

The analyses showed that, monoclonal infections were more common in Sénégal, with a high frequency of single mutant alleles at codons 437 in *dhps* and codons 51 ($p = 0.0003$), 59 ($p = 0.0003$) and 108 ($p = 0.012$) in *dhfr*. However, the vast majority of infections are polyclonal in Tanzania, and the frequency of mixed allele calls was also higher compared to Sénégal just as mixed allele was more represented in monogenic infections (codons 51 and 59 ($p = 0.04$)) and polygenomic infections (codons 437 ($p = 0.02$) and 51 ($p = 0.002$), codons 59 ($p = 0.008$) and 108 ($p = 0.04$) (Table 2).

Typing resistance alleles by either PCR-RFLP or HRM yields a result for all parasite genomes in a given patient sample. In an attempt to tease out the number of resistant “genomes” in the patient population, drug resistant allele typing was combined with MSP typing data to determine the number of wild-type or mutant genomes present at each locus (Table 3). Overall, there were more polygenomic infections in Tanzania (72%) compared to Sénégal (54%) (Table 3), although the difference was not statistically significant. However, when considering the average

multiplicity of infection for each site, Tanzania had a significantly higher MOI compared to Sénégal (MOI Tanzania = 2.6, compared to MOI Sénégal = 1.56; $p = 0.011$). The overall results remained unchanged whether the data was analysed as the resistance profile for the sample population (Table 2) or weighted based on the number of parasite genomes (Table 3).

When combining the mutant alleles into haplotypes, the single mutation S108 N ($p = 0.01$) and double mutation C59R/S108N ($p = 0.005$) in the *dhfr* gene were higher in Senegal than in Tanzania but the triple N51I/C59R/S108N mutation on *dhfr* gene and the quadruple N51I/C59R/S108N *dhfr* and A437G *dhps* gene mutation were more represented in Tanzania, albeit not significantly different (Table 4). The quintuple mutation was not observed in either site.

Discussion

This study assessed the accuracy of HRM in comparison with PCR-RFLP for detecting infections of *P. falciparum* in two areas Mlandizi, Tanzania and Thiès, Sénégal

Table 3 Prevalence of mutations in *dhfr* and *dhps* in Senegal and Tanzania when accounting for number of parasite genomes per sample

	Alleles	Parasite genome		
		Senegal	Tanzania	p value
DHPS 437	A437	27/80 (33.75%)	42/103 (40.78%)	0.9729
	G437	45/80 (56.25%)	39/103 (37.86%)	0.0131
	Undetermined	8/80 (10%)	22/103 (21.36%)	
DHPS 540	K540	80/80 (100%)	103/103 (100%)	>0.05
	E540	0/80 (0%)	0/103 (0%)	>0.05
	Undetermined	0/80 (0%)	0/103 (0%)	
DHPS 581	A581	80/80 (100%)	103/103 (100%)	>0.05
	G581	0/80 (0%)	0/103 (0%)	>0.05
	Undetermined	0/80 (0%)	0/103 (0%)	
DHPS 613	A613	75/80 (3.75%)	100/103 (97.09%)	0.2713
	T/S613	2/80 (2.5%)	0/103 (0%)	0.1074
	Undetermined	3/80 (3.75%)	3/103 (2.91%)	
DHFR 51	N51	0/80 (0%)	21/103 (20.39%)	0
	51I	77/80 (96.25%)	67/103 (65.05%)	0
	Undetermined	3/80 (3.75%)	15/103 (14.56%)	
DHFR 59	C59	1/80 (1.25%)	32/103 (31.07%)	0
	59R	76/80 (95%)	56/103 (54.37%)	0
	Undetermined	3/80 (3.75%)	15/103 (14.56%)	
DHFR 108	S108	0/80 (0%)	16/103 (15.5%)	0.0002
	N108	79/80 (98.75%)	87/103 (84.5%)	0.0096
	Undetermined	1/80 (1.25%)	0/103 (0%)	
	Polyclonal infections	27/50 (54%)	36/50 (72%)	0.0628
	Multiplicity of infection	78/50 (1.56)	103/50 (2.06)	0.011

The number of parasite genotypes per patient was calculated to estimate the wild-type and mutant allele frequencies in mixed infections. Undetermined represents samples in which the number of genotypes cannot be precisely classified due to uncertainty (for example, if there are 4 genomes, the call could be 1 WT and 3 Mut, 2 WT and 2 Mut, or 3 WT and 1 Mut)

Table 4 Prevalence of single, double, triple, quadruple and quintuple mutation in Tanzania and Senegal

	Single mutation (%)	Double mutation (%)	Triple mutation (%)	Quadruple mutation (%)	Quintuple mutation (%)
Senegal	20	22	44	52	0
Tanzania	2	2	48	58	0
p value	0.01	0.005	0.84	0.7	0

Mutant alleles from *dhfr*, *dhps* genes were combined to make the single mutation (S108N), double mutation (*dhfr* C59R/S108N), triple mutation (*dhfr* N51I/C59R/S108N), quadruple mutation (*dhfr* N51I/C59R/S108N *dhps* A437G) and quintuple mutation (N51I/C59R/S108N *dhfr* and A437G/K540E *dhps*).

two regions with variable endemicity and transmission intensity.

HRM analysis is comparable to PCR-RFLP for classifying SNPs; however, PCR-RFLP is laborious, time consuming, and requires a specific restriction enzyme for each SNP. This method also requires the separation of PCR products on a gel, which often takes hours to perform and increases the risk of contamination, making it difficult to genotype a large number of samples. Furthermore, interpretation of the digestion profiles can be subjective in cases of suboptimal digestion, low DNA yields, faint PCR products. Here, the results demonstrate that even when performed in a malaria-endemic laboratory setting, HRM is a rapid, accurate, powerful, economic, and a "closed-tube" mutation typing method that detects sequence variation within the PCR products, and can detect minor alleles in a mixed genotype population of parasite DNA. As described by previous studies, HRM can identify known and novel polymorphisms, detect multiple genotypes, and is both sensitive and specific [29, 30, 38–41]. This study applied the HRM technology to type polymorphisms in mixed genotype infections in two African countries.

In Tanzania, more mixed genotypes were identified by HRM than PCR/RFLP at codon 51 ($p = 0.005$), 59 and 108. In Senegal, a country with fewer polygenomic infections, no mixed infections was observed by PCR/RFLP, however several were detected by HRM, although the small number resulted in non-significant p-values (Table 1). These results demonstrate that HRM is more sensitive than PCR/RFLP and can easily detect mixed alleles. Since PCR-RFLP may not detect clones which are at low frequency in a mixed population, due to the qualitative nature of the assay, a minor allele could easily pass unnoticed. In contrast, HRM detected mixed infections at a higher frequency in both populations, suggesting that the technology of HRM to detect minor subpopulations is more sensitive than PCR-RFLP. While in countries like Senegal with few polygenomic infections and a

low multiplicity of infection, there may not be a significant difference in the techniques; whereas, the improved sensitivity and ability to detect minor alleles is more pronounced in sample populations such as Tanzania with a high prevalence of polygenomic infections and a higher multiplicity of infection. This makes HRM a more attractive and accurate method for typing samples from both countries, but especially in countries like Tanzania, which are characterized by a high frequency of mixed infections. Furthermore, the ability to detect rare, low-frequency drug resistance alleles is likely important for surveillance of these markers as drug pressure is applied and likely to select for such variants.

As HRM was the most sensitive method evaluated, it was used exclusively for determining the genotype of *dhfr* and *dhps* genes to look at the drug resistance profiles in both countries. The frequency of mutant alleles at codon 437 in *dhps* gene and at codons 51, 59 and 108 on *dhfr* gene associated with in vivo and in vitro to SP resistance [23, 42] was higher in Senegal and Tanzania (Table 2). These high frequencies of mutation were observed in a study conducted in Dakar, Senegal [43] and in Tanzania [44]. The presence of mutations at codons 540, 581 on *dhps* gene was not detected in either country.

In both countries, the high prevalence of mutations in *dhfr* and *dhps* could be explained by the use of SP as a second line treatment for malaria in Senegal and first line in Tanzania at the time of sample collection. In Senegal, SP has been used since 2003 in combination with amodiaquine for use as SMC for children; whereas, in Tanzania, SP was introduced in 2001 as first line treatment for uncomplicated malaria but removed in 2006 due to the high level of resistance observed in vivo and in vitro. SP remains the mainstay drug regime for intermittent preventative treatment of pregnant women (IPTp) in both countries. It is very possible that the continued use of SP may favour stepwise selection of mutations in these areas, contributing to the high prevalence of mutant alleles observed in this study. The mutation A437G in the *dhps* gene and N51I, C59R and S108N in *dhfr* gene were more prevalent in Senegal than in Tanzania (Tables 2 and 3), which is interesting given that there has been longer term SP pressure in Tanzania compared to Senegal. It has been observed in some studies that SP resistance emerges more rapidly in low-transmission compared to high-transmission areas [45], and this is consistent with the results of this study.

One potential confounder to the more frequent resistant alleles in Senegal compared to Tanzania is the difference in the MOI between the two sites. As many infections in Tanzania are polygenomic and contain a high MOI, it is possible that the number of mutant alleles circulating in the population is underestimated as both

PCR-RFLP and HRM can classify alleles as mutant or wild-type, but cannot determine the number of alleles of each (just the total population profile: all wild-type, all mutant, or mixed). To address this challenge, *msp-1* and *msp-2* typing data was combined with drug resistance allele typing to determine the number of wild-type or mutant parasite genomes (Table 3). When accounting for the frequency on a parasite genome basis (rather than a per human basis), the results do not significantly change as mutant alleles are still higher in Sénégal than Tanzania.

Often, studies report combinations of mutations in both *dhfr* and *dhps* as a way to compare with WHO guidelines for continued SP use. When combining mutant alleles, the single mutation (*dhfr* S108N) and the double mutation (*dhfr* C59R/S108N) was more represented in Sénégal than in Tanzania with $p = 0.01$ and $p = 0.005$ respectively (Table 4). Triple and quadruple mutations were not significantly different between the two sites, although they were high for both sample sets. Encouragingly, the quintuple mutation N511/C59R/S108N *dhfr* and A437G/K540E *dhps* gene, which is strongly associated with in vivo and in vitro SP resistance in East and Southern Africa [46, 47] was not observed, consistent with findings from previous studies in Sénégal by Ndiaye et al. [48, 49] and Wurtz et al. [43]. However, a recent study conducted in Sénégal found a single sample with the quintuple mutation [50], resulting in an overall population prevalence of 1.1%. In light of this result, continued and constant monitoring of drug resistance molecular markers is essential.

Conclusion

These results demonstrate the enhanced sensitivity of HRM assays to detect minor mutant alleles compared to PCR/RFLP strategies in samples derived from two endemic countries with different levels of malaria burden. Notably, Tanzania exhibited a higher MOI compared to Sénégal; and DHER mutations were more common among samples from Senegal, as compared to Tanzania. Based upon the mutant allele frequencies and the absence of quintuple mutations predictive for SP resistance these populations, these data indicate that SP likely remains efficacious for IPTp and SMC per WHO recommendations. However, as very recently a sample with the quintuple mutation was observed in Sénégal, continued and constant monitoring of drug resistance molecular markers by robust, sensitive, and field-deployable methods like HRM is a high priority.

Abbreviations

CQ: chloroquine; SP: sulfadoxine–pyrimethamine; ACT: artemisinin-based combination therapy; AQ: amodiaquine; SMC: seasonal malaria chemoprevention; IPT: intermittent pregnancy treatment; DHPS: dihydropteroate synthetase; DHFR: dihydrofolate reductase; WHO: World Health Organization; SNPs: single nucleotide polymorphisms; PCR-RFLP: polymerase chain

reaction–restriction fragment length polymorphism; DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis; HRM: high-resolution melting; MSP: merozoite surface protein; SLAP: Service de Lutte Antiparasitaire; ER: entomological inoculation rates; DNA: deoxyribonucleic acid; dNTPs: deoxyribonucleotides triphosphates; MgCl₂: chlorure de magnésium; pH: potentiel hydrogène; MOI: multiplicity of infection; WT: wild type; Mut: mutant; p : p value

Authors' contributions

YDN and CKD performed experiments and wrote the manuscript. ADA and DN conceived and designed the study, AKB conceived and designed the study, supervised the research, assisted with analysis, edited and reviewed the manuscript. BD, AM, NPM, RFD contributed materials and analysis tools and offered experimental advice. AG, MS, TN performed DNA extractions. ABD, ASB, MN and MD reviewed the manuscript. ZP, Nf, DW, SM, SKV, ADA and DN supervised the research, wrote, read, and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Laboratory of Parasitology Mycology, Aristide Le Dantec Hospital, Faculty of Medicine and Pharmacy, Cheikh Anta Diop University, 5005 Dakar, Senegal. ²Laboratory of Bacteriology and Virology, Hospital Aristide Le Dantec, 7325 Dakar, Senegal. ³Department of Parasitology and Medical Entomology, Muhimbili University College of Health Sciences, Dar-es-Salaam, Tanzania. ⁴Tulane University, New Orleans, LA, USA. ⁵The International Centers of Excellence for Malaria Research (ICEMR) Program, Dakar, Senegal. ⁶Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard TH Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA. ⁷Department of Pathology, Aga Khan University Hospital, Nairobi, Kenya. ⁸Infectious Disease Initiative, The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. ⁹School of Nursing and Health Sciences, Simmons College, Boston, MA 02115, USA.

Acknowledgements

We would wish to acknowledge Christopher D. Merritt, Marycelina Muhi, and Billy Ngasala for assistance with sample collection and the staff at the Mlandizi Health Center and Muhimbili University College of Health Sciences for their support in seeing this work through to completion. We thank also NIH for funding the ICEMRWAF project, the population of Medina fall in Thies, the patients, the data manager team of ICEMR including Julie T. Gomis, Daba Zoumarou, Mame Fama Ndiaye, Ndéye Astou Keita, the sample collection team in Sénégal, including Younouss Diedhiou, Lamine Ndiaye, Amadou Moustaf Mbaye, Mousa Dieng Sarr, and Ngayo Sy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from all patient for publication of this study.

Ethics approval

These studies were approved by the Tanzanian Commission for Science and Technology (Permit No. 2003-207-CC-2003-102) together the Ethics Committee of the Ministry of Health in Senegal (0127MSAS/DPRS/CNRES). Ethical review and approval was then provided by both the Harvard TH Chan School of Public Health Human Subjects Committee (P11778/191), and the Human Subjects Committee of Tulane University, New Orleans.

Funding

This work was supported by a U.S. Department of State Fulbright Fellowship to A. K. B. a Bill and Melinda Gates Foundation grant to D. F. W., and the NIH/ICEMRWAF (International Centers of Excellence for Malaria Research, West Africa U19AI089099).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 16 September 2016 Accepted: 8 April 2017
Published online: 19 April 2017

References

- Bhart S, Weiss DJ, Cameron E, Bianzoli D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015;526:207–11.
- WHO World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/20016/1/9789241565156_eng.pdf.
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Länglois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505:50–5.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009;361:455–67.
- PNLP Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Sénégal 2016–2020; 2016.
- PNLP Cadre Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Sénégal 2014–2018; 2014.
- Mubi M, Kakoko D, Ngasala B, Premji Z, Peterson S, Björkman A, et al. Malaria diagnosis and treatment practices following introduction of rapid diagnostic tests in Kibaha District, Coast Region, Tanzania. *Malar J*. 2013;12:293.
- NMCP National guidelines for diagnosis and treatment of malaria; 2006. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19271e>.
- Ndiaye S. Enquête Nationale sur le Paludisme au Sénégal 2008–2009; 2009. <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/MI55/MI55revised3>.
- Menendez C, Baidjari A, Sigauque B, Sanz S, Aponte JJ, Mabunda S, et al. Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PLoS ONE*. 2010;5:9438.
- WHO-MPACS. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of September 2012 meeting. *Malar J*. 2012;2012(11):424.
- Matondo SI, Temba GS, Kayishe AA, Kauki JS, Kadiga A, van Zwetselaar M, et al. High levels of sulphadoxine-pyrimethamine resistance PfDfr1-Pfdhps quintuple mutations: a cross sectional survey of six regions in Tanzania. *Malar J*. 2014;13:152.
- Bzik DJ, UWB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:8360–4.
- Cowman AF, Morry MJ, Bligg BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9109–13.
- Peterson DS, Walliker D, Wellemis TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9114–8.
- Peterson DS, Milhous WK, Wellemis TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:3018–22.
- Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:3014–7.
- Basco LK, Elin de Peçoulas P, Wilson CM, Le Bras J, Mazabraud A. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;69:135–8.
- Reeder JC, Rieckmann KH, Genton B, Lorry K, Wines B, Cowman A. Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropterotate synthetase genes and in vitro susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:209–13.
- Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase dihydropterotate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*. 1994;224:397–405.
- Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropterotate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:7149–53.
- Blick J, Basco LK, Ringwald P. Assessment of three in vitro tests and an in vivo test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 1998;36:243–7.
- Wang P, Read M, Sims PFHJ. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropterotate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation. *Mol Microbiol*. 1997;23:979–86.
- Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001;344:299–302.
- Warsame M, Weirsdorfer WH, Payne D, Björkman A. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* in vitro to chloroquine, mefloquine, quinine and sulfadoxine/pyrimethamine in Somalia: relationships between the responses to the different drugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;85:565–9.
- Andriantsoanirina V, Durant R, Ménard D. Mutations PfDfr 164L chez *P. falciparum*: dynamique d'émergence et diffusion des haplotypes circulants à Madagascar, évaluation de leur résistance in vitro à la pyriméthamine. Rapport d'activité IMEA; 2009.
- Durasinigh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropterotate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol*. 1998;198(89):1–8.
- O'Meara D. Molecular tools for nucleic acid analysis. Stockholm: Dep. Biotechnology, Royal Institute of Technology; 2001. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:8999/FULLTEXT01.pdf>.
- Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séné PD, Sabeti PC, et al. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:2976–86.
- Andriantsoanirina V, Lascombe V, Ratsimbisoa A, Bouchier C, Hoffman J, Tichit M, et al. Rapid detection of point mutations in *Plasmodium falciparum* genes associated with antimalarial drugs resistance by using high-resolution melting analysis. *J Microbiol Methods*. 2009;78:165–70.
- Gan LS, Loh JP. Rapid identification of chloroquine and atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* using high-resolution melt polymerase chain reaction. *Malar J*. 2010;9:134.
- Reed GH, Kent JQ, Wittwer DT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenetics*. 2007;8:597–608.
- PNLP Plan Stratégique National 2011–2015. Dakar: PNL; 2010. http://www.afncan.chdforum.org/cd/policy/country/senegal/senegal_malaria_2011-2015_fr.pdf.
- Nimba SEDI. Assessing the impact of education intervention for improving management of malaria and other childhood illness in Kibaha District-Tanzania. *East Afr J Public Health*. 2007;4:5–11.
- Jelinek T, Rénin AM, Leming MM, Curtis J, Mhina J, Durasinigh MT, et al. Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropterotate synthetase (DHPs) genes of *Plasmodium falciparum* and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health*. 1998;3:605–9.
- Miller LH, Robens T, Shahabuddin M, McCutchan T. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol*. 1993;59:1–14.
- Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DT, Anders RF. Structural diversity in the 45 kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;39:227–34.
- Snounou G, Zhu X, Siripaon N, Janta W, Thaitong S, Brown KN, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;93:369–74.
- Mze NR, Ndiaye YD, Diedhiou CK, Rahamatou S, Diye B, Daniels RF, et al. RDTs as a source of DNA to study *Plasmodium falciparum* drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands. *Malar J*. 2015;14:373.
- Cruz RE, Shokoples SE, Manage DP, Yanow SK. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* dhfr gene by asymmetric PCR and melt-curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3081–7.

41. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*. 2004;50:1748–54.
42. Traore K, Lavoignat A, Bonnot G, Sow F, Bess GC, Chavant M, et al. Drying anti-malarial drugs in vitro tests to outsource SYBR green assays. *Malar J*. 2015;14:90.
43. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, Bané E, et al. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J*. 2012;11:197.
44. Baraka V, Ishengoma DS, Francis F, Minja DT, Madebe RA, Ngatunga D, et al. High-level *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance with the concomitant occurrence of septuplet haplotype III Tanzania. *Malar J*. 2015;14:439.
45. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*. 2004;113:J084–82.
46. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu IL, Monyama Y, Lum JK, et al. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop*. 2003;85:363–73.
47. Roper C, Peate R, Bredenkamp B, Gumedde J, Drakeley C, Moshia F, et al. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*. 2003;361:1174–81.
48. Ndiaye D, Dally JP, Sam D, Ndi Q, Gaye O, Mboup S, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health*. 2005;4:1176–9.
49. Ndiaye D, Diéye B, Ndiaye YD, Van Tyne D, Daniels R, Bei AK, et al. Polymorphism in dhfr/dhps genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2013;3:135–42.
50. Boussarogue A, Fall B, Madamet M, Wade KA, Fall M, Nkoulma A, et al. Prevalence of anti-malarial resistance genes in Dakar, Senegal from 2013 to 2014. *Malar J*. 2016;15:347.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access



RDTs as a source of DNA to study *Plasmodium falciparum* drug resistance in isolates from Senegal and the Comoros Islands

Nasserdine Papa Mze^{1*}, Yaye Die Ndiaye², Cyrille K. Diedhiou¹, Silai Rahamatou³, Baba Dieye², Rachel F. Daniels⁴, Elizabeth J. Hamilton⁵, Mouhamadou Diallo¹, Amy K. Bel^{1,4}, Dyann F. Wirth^{4,6}, Souleymane Mboup¹, Sarah K. Volkman^{4,6,7}, Ambroise D. Ahouidi^{1†} and Daouda Ndiaye^{2†}

Abstract

Background: The World Health Organization has recommended rapid diagnostic tests (RDTs) for use in the diagnosis of suspected malaria cases. In addition to providing quick and accurate detection of *Plasmodium* parasite proteins in the blood, these tests can be used as sources of DNA for further genetic studies. As sulfadoxine-pyrimethamine is used currently for intermittent presumptive treatment of pregnant women in both Senegal and in the Comoros Islands, resistance mutations in the *dhfr* and *dhps* genes were investigated using DNA extracted from RDTs.

Methods: The proximal portion of the nitrocellulose membrane of discarded RDTs was used for DNA extraction. This genomic DNA was amplified using HRM to genotype the molecular markers involved in resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: *dhfr* (51, 59, 108, and 164) and *dhps* (436, 437, 540, 581, and 613). Additionally, the *msp1* and *msp2* genes were amplified to determine the average clonality between Grande-Comore (Comoros) and Thiès (Senegal).

Results: A total of 201 samples were successfully genotyped at all codons by HRM; whereas, in 200 *msp1* and *msp2* genes were successfully amplified and genotyped by nested PCR. A high prevalence of resistance mutations were observed in the *dhfr* gene at codons 51, 59, and 108 as well as in the *dhps* gene at codons 437 and 436. A novel mutant in *dhps* at codon positions 436Y/437A was observed. The *dhfr* I164L codon and *dhps* K540 and *dhps* A581G codons had 100 % wild type alleles in all samples.

Conclusion: The utility of field-collected RDTs was validated as a source of DNA for genetic studies interrogating frequencies of drug resistance mutations, using two different molecular methods (PCR and High Resolution Melting). RDTs should not be discarded after use as they can be a valuable source of DNA for genetic and epidemiological studies in sites where filter paper or venous blood collected samples are nonexistent.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, RDT, DNA source, *dhfr*, *dhps*, Comoros, Senegal

Background

Malaria remains a major public health problem as it is responsible for 207 million cases and 627,000 deaths

worldwide [1]. Currently, 90 % of the deaths attributable to this infection occur in sub-Saharan Africa. To combat this disease, many programmes have implemented control measures such as the distribution of long-lasting insecticide-treated mosquito nets, the use of artemisinin-based combination therapy (ACT) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria, and the introduction of rapid diagnostics tests (RDTs) in health facilities for malaria diagnosis. Such interventions have

*Correspondence: npapamze@gmail.com

†Ambroise D. Ahouidi and Daouda Ndiaye contributed equally to this work

¹Laboratory of Bacteriology-Virology, Hospital Aristide Le Dantec, 7325 Dakar, Senegal

Full list of author information is available at the end of the article

contributed to a dramatic drop in malaria-attributable deaths worldwide [1].

Widespread RDT use has greatly assisted in the accurate diagnosis of presumed malaria cases in regions where microscopy (or molecular methods) are non-existent. RDTs are based on antigen detection and these antigens, as well as parasite DNA, remain on the discarded RDT after it has been used for patient diagnosis. The widespread use of RDTs for diagnosis creates a valuable resource for population-based studies as RDTs have been shown to be suitable material for genetic studies, as DNA can be extracted from RDTs [2–5].

To validate the utility of field-collected RDTs for typing of drug resistance markers, two markers involved in sulfadoxine-pyrimethamine (SP, Fansidar[®]) resistance were selected: *dhfr* and *dhps* genes, as these both drugs are routinely used in the populations of interest (Senegal and Comoros). Until recently, SP was one of the main molecules for the treatment of uncomplicated malaria [6, 7]. However, resistance to SP has evolved quickly [8]. SP is a combination of two drugs that act at two successive stages of the parasite folate pathway. Sulfadoxine inhibits the *dihydropteroate synthetase* gene (*dhps*), while pyrimethamine inhibits *dihydrofolate reductase* gene (*dhfr*). Point mutations in the *dhfr* and *dhps* genes confer resistance to pyrimethamine and sulfadoxine, respectively, with a decrease of in vitro susceptibility of *P. falciparum* in relation to the number of mutations of each gene [9–13]. Although this molecule has seen a relative decline of its therapeutic efficacy, it is now used in Senegal for the Intermittent Preventive Treatment (IPT) of pregnant women and children against malaria, and in Comoros, for IPT of pregnant women, a policy change that was implemented in 2003 and 2004, respectively.

While many studies measuring the prevalence of *dhfr* and *dhps* mutations have been conducted previously in Senegal [14–19], few have been performed in Comoros [20–22], largely due to a lack of clinical studies in which venous blood or filter paper are collected to study parasite molecular markers. The objectives of this study were (1) to assess the feasibility of DNA extraction from field-collected RDTs, (2) to study gene mutations *dhfr* (S108N, N51I, C59R and I164L) and *dhps* (A437G, S436F, K540E, A581G and A613T/S) from samples of Senegal and Comoros with high-resolution melting technology and compare the prevalence between these two countries. *Msp* typing was used as a tool to compare the average multiplicity of infection between the two countries.

Methods

Study sites and sample collection

The Comoros islands are located on the southeastern coast of Africa in the Mozambique canal, and represent

a country where malaria transmission is high [23]. In Grand-Comore, the largest of the four islands of Comoros, the malaria transmission is meso- to hyper-endemic (EIR between 10 and 200) [20]. In contrast, Senegal has Sahalien characteristics marked by a transmission that is seasonal and short. Samples collected for this study were from Thiès, an urban area 70 km east of Dakar, where malaria is hypoendemic [24], with an EIR between 1 and 5.

In Grande-Comore, RDT samples were collected from 2012 to 2013 by the National Malaria Control Programme in the city of Moroni, where malaria is hypoendemic; and in two hospitals Mitsamiouli and Mbeni where malaria is mesoendemic and meso to hyperendemic respectively [20]. In Senegal, RDT samples were collected in 2010 at the Service de Lutte Anti-Parasitaire (SLAP) clinic, in Thiès. Malaria positive RDTs were stored at room temperature with desiccant at both sites.

Rapid diagnostic tests and DNA extraction

In Senegal, SD BIOLINE Malaria rapid test for Pf alone (SD Biotline, 05FK50) was used while in Comoros two different tests were used: Malaria pLDH/HRP2 Combo (Access Bio, PBX-KM30003) and SD BIOLINE Malaria Ag Pf/Pan (SD Biotline, 05FK60). The proximal third of the nitrocellulose membrane was chosen for DNA extraction as previously described [2]. DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations for filter paper. In total, 204 samples (124 from Grande-Comore and 80 from Thiès) were extracted and genotyped.

Single nucleotide polymorphism analyses by high resolution melting

SNP analysis for mutations in *dhfr* (S108N, N51I, C59R and I164L) and *dhps* (A437G, S436F, K540E, A581G and A613T/S) genes were conducted by High Resolution Melting (HRM) analysis using a Light Scanner LS-32, according to previously published methodology [18]. Asymmetric PCR was performed with final primer concentrations of 0.25 μ M reverse primer; 0.05 μ M forward primer; and a final probe concentration of 0.02 μ M. The cycling and melting conditions for *dhps* amplification were as follows: 95 °C denaturation for 1 min, followed by 55 cycles of (95 °C for 5 s and 66 °C for 30 s) a pre-melt cycle of 5 s each at 95 °C and 37 °C, followed by a melt from 45 to 90 °C at a 0.30 °C/s. For the 437 *dhps* assay, cycling and melting conditions were as follows: 95 °C denaturation for 1 min, followed by 55 cycles of (95 °C for 5 s, 66 °C for 30 s, 74 °C for 30 s) a pre-melt cycle of 5 s each at 95 and 37 °C, followed by a melt from 45 to 90 °C at a 0.30 °C/s. The cycling and melting conditions for *dhfr* amplification were as follows: 95 °C denaturation

for 1 min, followed by 55 cycles of (95 °C for 5 s, 56 °C for 30 s) a pre-melt cycle of 5 s each at 95 and 37 °C, followed by a melt from 45 to 90 °C at a 0.30 °C/s.

DNA sequencing

PCR sequencing (Sanger sequencing) of the *dhps* 436/437 amplicon was performed by using the same primers used in the HRM reaction (Forward: GAATGTTTG AAATGATAAATGAAGGTGCTA and Reverse: CAGG AAACAGCTATGACGAAATAATTGTAATACAGG TACTACTAAATCTCT). Sequencing was performed in both the forward and the reverse direction by Macrogen and contigs were assembled using Lasergene 10.

Allelic typing of *Plasmodium falciparum* *msp1* and *msp2*

The polymorphic regions (block 2 of *MSP1* and block 3 of *MSP2*) were amplified as previously described [25]. All PCR reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 6 µl Gotaq, 0.5 µM of each primer, and 11 µl reagent grade water. In the first round reaction (nest 1), 1 µl of genomic DNA was added as a template. In the second nested reaction (nest 2), 1 µl of the nest 1 PCR product was used as DNA template.

The cycling conditions for the nest 1 PCR were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of (94 °C for 1 min, 58 °C for 2 min, 72 °C for 2 min), with a final extension cycle of 72 °C for 3 min. The cycling conditions for the nest 2 PCR were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of (94 °C for 1 min, 61 °C for 2 min, 72 °C for 2 min), with a final extension cycle of 72 °C for 3 min. Positive controls (3D7 for K1 and IC27 alleles, Dd2 for MAD20 and FC27 alleles, and 7G8 for the RO33 allele) and negative control (reagent grade water alone) were run in each PCR reaction. PCR products were analyzed on 2 % agarose gels stained with ethidium bromide and visualized by UV trans-illumination (BioradGel Doc™ XR + System with Image Lab). The size of resulting DNA bands were approximated using Gene Ruler 100 bp DNA ladder marker (Quick Load).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Z-test for two population proportions to compare mutant allele prevalence between Comoros and Senegal samples. For all tests, the significance level was $\alpha = 0.05$.

Results

The prevalence of mutations in *dhfr* and *dhps*

Genotyping of *dhps* and *dhfr* genes was performed for 201 samples ($n = 124$ for Grande-Comore and $n = 77$ for Thiès). For *dhfr* codons 51/59, only 62 samples from Thiès and 96 samples from Grande-Comore yielded a successful genotyping result; whereas at all other loci, genotyping was successful for all samples (Table 1).

In Thiès, for the *dhfr* gene, 90 % (54/60) of the samples had the mutant allele at codons *dhfr* N51C/C59R, and 95.8 % (68/71) had the mutant allele at codon *dhfr* S108 N. For the *dhps* gene 1.33 % (1/75) had the A613T mutant allele and 53.9 % (41/76) of the samples had the A437G mutant allele. At the S436 codon of *dhps* 12 % (9/77) of the samples had the mutant allele S436F, a recently characterized mutation described previously [18]. For all other codons (namely, *dhfr* I164, *dhps* K540, and *dhps* A581) 100 % of the samples had the wild-type allele. Previously unreported mutations were observed for *dhps* gene at codons 436/437 by HRM (Fig. 1a) and were confirmed to be S436Y/437A by Sanger sequencing (Fig. 2).

In Grande-Comore, for the *dhfr* gene, 93.4 % (115/123) had the S108 N mutation, 62.5 % (60/96) of the samples had the N51I mutant allele, and 69.8 % (67/96) of all samples had the C59R mutant allele. For the *dhps* gene, at position A437, 29.8 % (37/124) of samples had the mutant allele A437G. For all other codons (namely, *dhfr* I164, *dhps* K540, *dhps* A581, *dhps* A613, and *dhps* S436), 100 % of the samples had the wild-type allele.

A statistically significant difference was observed in the prevalence of mutations between the Comoros and Senegal for the *dhfr* gene codons 51 (0.0001), and 59 ($p = 0.003$), and *dhps* gene codons 436 ($p = 0.0001$) and

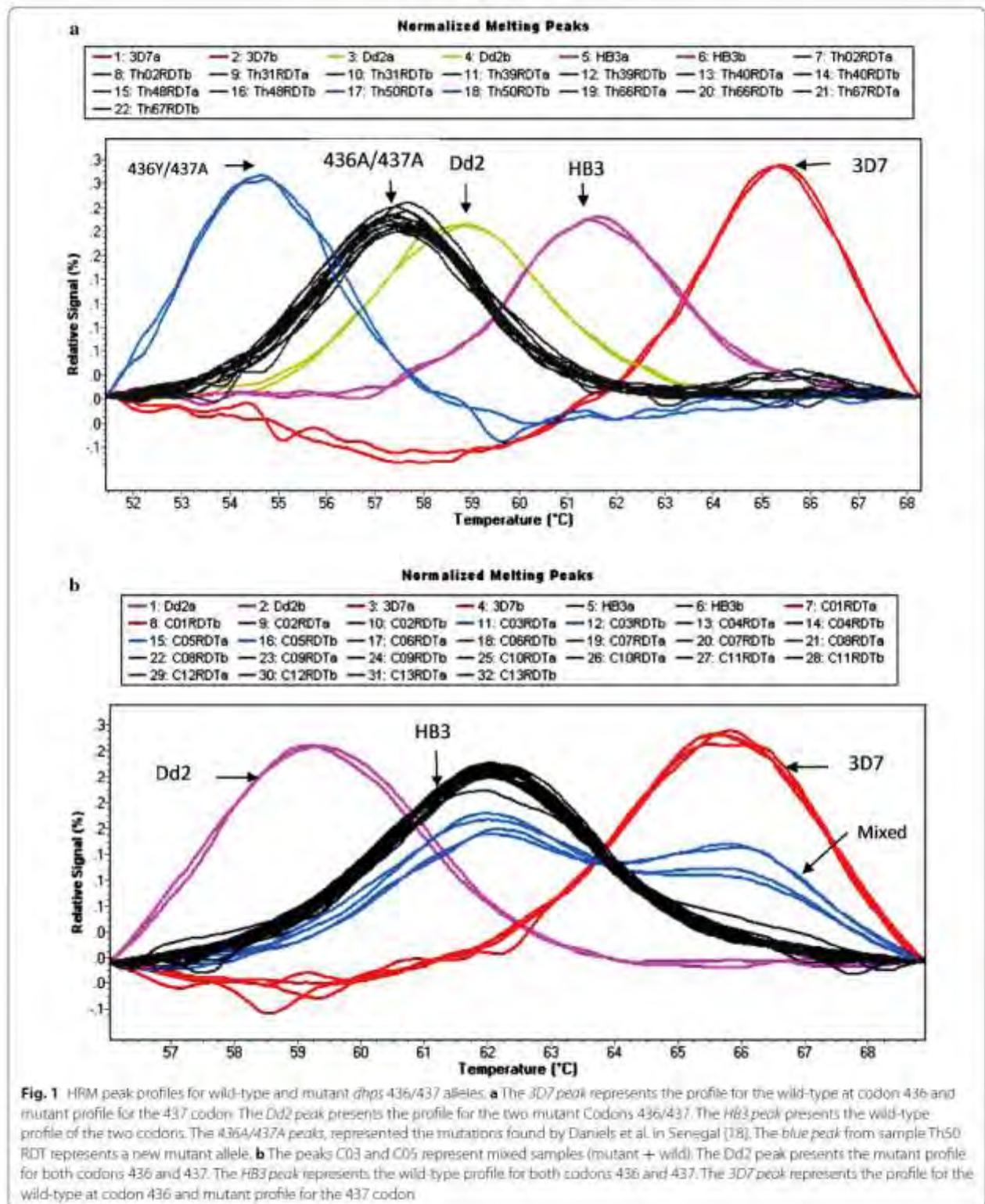
Table 1 Utility of RDTs as a source of DNA for genotyping loci involved in diversity and drug resistance

RDT Brand	Number RDT	HRM ^a Positive	HRM ^a Negative	PCR ^b Positive	PCR ^b Negative	Fragment used RDT
SD Bioline malaria Rapid test pf	80	77	3	77	3	1/3 HC
SD Bioline malaria Ag Pf/Pan	13	13	0	13	0	1/3 HC
Malaria pLDH/HRP2 combo	111	111	0	110	1	1/3 HC
Total	304	201 ^c	3	200	4	-

^a The HRM method was used for genotyping *dhfr* and *dhps* genes

^b PCR was used to genotype *msp1* and *msp2*

^c For codons 51/59, only 62 samples from Thiès and 96 samples from Grande-Comore gave a comprehensive genotyping



a

3D7 TTATAGATATAGGTGGAGAATCCT**TCTGGT**CCTTTTGTATACCTAAT

 TH50 TTATAGATATAGGTGGAGAATCCT**TATGCT**CCTTTTGTATACCTAAT

b

3D7 MFEMINEGASVIDIGGESS**SG**PFVIPNPKISERDLVVPVLQLF

 TH50 MFEMINEGASVIDIGGESS**YAP**PFVIPNPKISERDLVVPVLQLF

Fig. 2 Sequencing sample TH050. **a** DNA; **b** amino acid. To confirm the new mutant profile obtained from HRM sequencing was performed. After alignment of the nucleotides sequences we found new mutations in *dhps* 436Y/437A. The TAT codon corresponds to tyrosine (Y) and the codon GCT corresponding to the alanine (A)

437 ($p = 0.0007$). The prevalence of mutations on the *dhfr* gene at codon 51 and 59 and *dhps* gene at codon 436 and at codon 437 were higher in Thiès compared to Grande-Comore.

The single mutation (S108N alone, in the absence of other *dhfr* mutations) was not found in Thiès; whereas, in Grande-Comore it was present at 1.6 % (2/122) (Fig. 3). The prevalence of the double mutation (*dhfr* C59R and S108N) was 9 % (6/67) in Thiès and 25.4 % (31/122) in Grande-Comore (Fig. 3). However, the triple mutation (*dhfr* S108N, N51I, and C59R) was present at similar prevalences in both countries with 44.3 % (28/122) in Grande-Comore and 42 % (28/67) in Thiès; whereas the quadruple mutation (*dhfr* S108N, N51I, C59R, and *dhps* A437G) was observed at 28.7 % (35/122) in Grande-Comore and 49 % (33/67) in Thiès (Fig. 3). No quintuple

mutations (*dhfr* S108N, N51I, C59R, *dhps* A437G, and K540E) were observed in either country. Statistically, there was no significant difference in the prevalence of single ($p = 0.29$) and triple mutation ($p = 0.74$); however there was significance difference in the prevalence of double mutation ($p = 0.0063$) and the quadruple mutation ($p = 0.0048$) between the two countries using Z-test for 2 population proportions (Fig. 3).

When comparing the number of mixed alleles (mutant + wild) detected by HRM, overall mixed alleles were more prevalent in Grande-Comore samples than in samples from Thiès. An example of the HRM output for mixed alleles is shown in Fig. 1b. The difference in mixed alleles at *dhfr* position 108 and *dhps* position 437 was not significantly different between the two sites [*dhfr* 108: Grande-Comore 4 mixed samples (3 %); Thiès 3 mixed

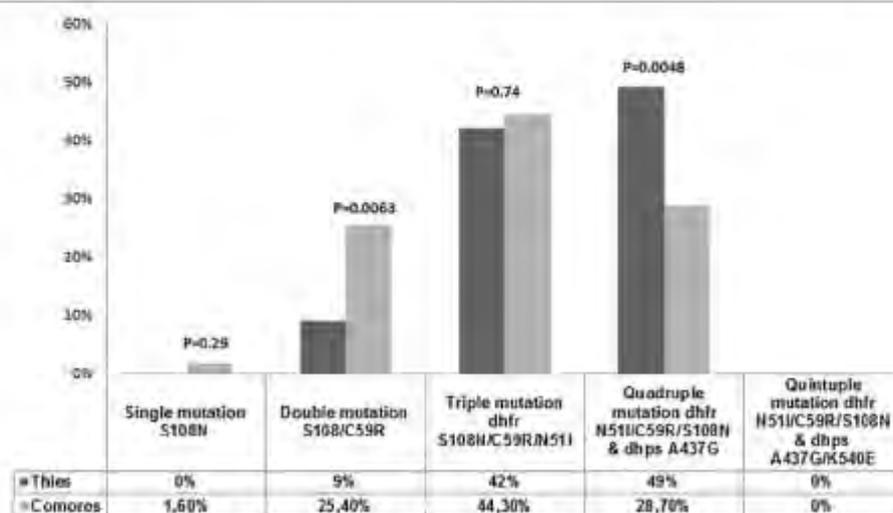


Fig. 3 Prevalence of single, double, triple, quadruple and quintuple mutation, in Comoros and Senegal. The prevalence of single (S108N), double (S108N/C59R), triple (N51I/C59R/S108N), quadruple (N51I/C59R/S108N/A437G) and quintuple (N51I/C59R/S108N/A437G/K540E) mutation was determined by counting the number of mutants present only in one, two, three, four or five Codons respectively. The Z-test for two population proportions is used to determine the P values, with a significance level of $\alpha = 0.05$.

(4 %) samples ($p = 0.77$); *dhps* 437; Grande-Comore 5 mixed samples (4 %); Thiès 2 mixed samples (2.6 %) ($p = 0.60$). In contrast, in Grande-Comore a significant difference in the prevalence of mixed alleles at *dhfr* 51/59 was observed. In Grande-Comore, 27 mixed samples (28 %) at *dhfr* codons 51/59 compared to six mixed samples (9 %) in Thiès ($p = 0.003$) were observed.

Genotyping using *msp1* and *msp2*

Having validated the RDT-extracted DNA to study markers of drug resistance, the average clonality in both populations was determined by *msp* typing. With samples from Thiès, a total of 77 samples were positive for *msp1* and *msp2* genes, with 3 samples failing to amplify (Table 1). In total, 36 samples (64.2 %) contained polyclonal infection at least with 2 clones. The average multiplicity of infection (MOI) for all isolates from Thiès was estimated to be 1.57.

With samples from Grande-Comore, a total of 123 samples were positive for *msp1* and *msp2* genotyping, with only a single sample failing amplification (Table 1). In total, 42 samples (43.7 %) had polyclonal infections at least with 2 clones. The average multiplicity of infection (MOI) was 1.47.

Discussion

The WHO recommends that all suspected malaria cases be confirmed by RDTs. RDTs facilitate the diagnosis of malaria by providing evidence of the presence of specific *Plasmodium* antigens in human blood without the need for electricity or advanced microscopy training. Previous studies have shown that it is possible to extract *Plasmodium* DNA from RDTs [2, 3, 5]. This study sought to address whether the use of stored, discarded RDTs from field sites can serve as source of DNA for genomic studies in populations in which whole blood or filter paper-based DNA samples are unavailable.

There are many factors that could affect the efficacy of extracting DNA from field-based RDTs. Some of these factors include variable preparation of RDTs (variable blood volumes), and storage conditions. Storage conditions in field sites can differ, introducing the possibility of bacterial or fungal contamination as well as DNA degradation. Another variable to consider is the proportion of human DNA to *Plasmodium* DNA on each RDT as the ability to detect *Plasmodium* genes will depend on the specific concentration of *Plasmodium* DNA. Taking all these field-based realities into consideration, the methodology outlined by Cnops et al. [2] was applied to the field as overall, RDTs represent a cost-efficient method for the conservation, transport, and storage of DNA samples. This study addresses the reality of using RDTs from

malaria endemic sites as sources of genetic material for performing molecular studies.

To test the performance of field-RDT extracted DNA for genetic experiments, two genetic methodologies were employed: high resolution melting (HRM) for drug resistance markers (*dhfr* and *dhps*) and *msp* typing by PCR to determine clonality. Differences in malaria transmission reported between Grande-Comore (meso-hyperendemic) and Thiès (hypoendemic) were compared by *msp* typing, and a small, but insignificant difference was observed in the multiplicity of infection for *msp* genes (*msp1* and *msp2*) (MOI = 1.57 in Thiès and MOI = 1.47 in Grande-Comore). This small difference is interesting given the predicted higher endemicity of Grande-Comore compared to Thiès.

HRM is a method that uses post-PCR melting analysis used to identify SNPs in nucleic acid sequences, and has a limit of detection of 100 fg of DNA [18]. In this study, successful genotyping by HRM was performed from DNA extracted from RDTs. An additional methodological advantage of HRM is that known mutations can be classified and novel mutations can be identified, such as the 436Y/437A mutations in *dhps*, which were identified in a sample from Thiès (Fig. 1a). When results are compared from RDT-extracted DNA to previous results obtained with the filter-paper extracted DNA using the same HRM method from the same population (Thiès, Senegal), similar frequencies for *dhfr* mutations at codons 51, 59 and 108 and *dhps* mutations at codon 437 [18] were observed.

Having confidence in the results obtained for Thiès, Senegal, this validated approach was applied to a population lacking filter paper or venous blood DNA samples: Comoros. In 2005, with declining CQ efficacy in Comoros, SP monotherapy efficacy studies were performed and while SP showed good clinical and parasitological responses (90–100 %), concerns were raised regarding the high prevalence of *dhfr* S108N mutations [21, 22]. In 2003, CQ was the first line treatment for malaria, with SP as the second-line drug. In 2005, CQ was replaced by artemether-lumefantrine for treatment of clinical malaria, although SP is still used for IPT in pregnant women to date. Very few molecular studies of drug resistance markers have been published for Comoros [20–22]. Interestingly, the number of mutations in Grande-Comore were significantly higher in this study (2012–2013) compared to what was shown by Rebaudet et al. [20] (Additional file 1: Table S1), specifically at *dhfr* codon 51 (38.5 % in 2010 compared to 62.5 % in 2012–2013; $p = 0.02$), *dhfr* position 108 (50 % in 2010 compared to 93 % in 2012–2013; $p < 0.05$) and *dhps* codon 437 (4 % in 2010 compared to 29.8 % in 2012–2013;

$p = 0.006$). A significant increase in the number of mixed alleles at *dhfr* C59 and C59R (7.7 % in 2010 compared to 28 % in 2012–2013; $p = 0.03$) was observed and a trending increase in the number of mixed alleles at *dhps* A437 and A437G (Fig. 1b); albeit non-significant (0 % in 2010 compared to 4 % in 2012–2013, $p = 0.3$) (Additional file 1: Table S1). However, a decrease in mixed alleles *dhfr* S108 and S108 N (15.4 % in 2010 compared to 3.25 % in 2012–2013; $p = 0.01$) was observed. Of concern, a statistically significant increase in the triple mutation *dhfr* N511/C59R/S108 N (50 % in 2010 compared to 89.6 % in 2012–2013; $p < 0.05$) was observed in this study. Other studies performed in Comoros in 2004–2006 [26] and 2006 [27] showed similar triple mutation frequencies (53 and 45 %, respectively) to the 50 % reported by Rebaudet et al. [20], indicating a very recent increase in triple mutation prevalence.

This high prevalence of mutations could potentially be explained by the use of SP for IPT but also by the fact that SP has been used as treatment for uncomplicated malaria [28]. On the other hand, the widespread use of trimethoprim-sulfamethoxazole (Cotrimoxazole® or Bactrim®) in Comoros, a drug similar to SP that has the ability to select for resistant mutants [29, 30] could also potentially explain the higher frequencies of mutant alleles between 2010 and 2012/2013.

Drug resistance mutations highly associated with drug failure in both countries were compared, and encouragingly, the quintuple mutant *dhfr* 511/59R/108N + *dhps* 437G/540E which is a key mutation associated with clinical failure to SP [31, 32] was not observed, in either Grande-Comore or in Thiès, Senegal. This lack of the quintuple mutation has been reported in previous studies [14–19], with the exception of one study by Andriantsoanirina et al. where a 0.4 % prevalence of the mutation A437G/K540E was observed in Comoros [27]. While, SP can be still used for IPT as recommended by World Health Organization [33], vigilance is needed as the WHO recommends replacing SP monotherapy if the prevalence of the K540E mutation exceeds 50 % in the population [33, 34]. These results taken together suggest that yearly monitoring of SP drug resistance in Comoros needs to be a policy priority as it will be important to assess the future efficacy of SP as a drug for IPT.

Conclusion

In conclusion, drug resistance monitoring in Comoros is a critical area of future ongoing research. DNA extracted from RDTs can be a useful source of DNA for genetic epidemiological studies. DNA extracted from RDTs can be an alternative to filter paper or venous blood when such samples are not available.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Prevalence of *dhfr* and *dhps* alleles in Comoros over time. Prevalences in *dhfr* and *dhps* mutations were compared from Rebaudet et al. in 2010 and this study in 2012–2013.

Authors' contributions

NPM performed experiments and wrote the manuscript. ADA and DN conceived and designed the study. AFB supervised the research, assisted with analysis, edited and reviewed the manuscript. SR contributed materials and analysis tools and offered experimental advice. YDN and BD performed DNA extractions, performed initial validation and offered experimental advice. CKD contributed to data analysis and reviewed the manuscript. RFD and LH generated the sequence data. MD gave constructive advice and reviewed the manuscript. DW, SM, SKV, ADA and DN supervised the research, wrote, read, and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Laboratory of Bacteriology-Virology, Hospital Arribe Le Dantec, 7325 Dakar, Senegal. ²Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Faculty of Medicine and Pharmacy, Cheikh Anta Diop University, 5005 Dakar, Senegal. ³Laboratory of National Malaria Control Programme, Moroni, Comoros. ⁴Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA. ⁵Department of Human Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA. ⁶Broad Institute: The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. ⁷School of Nursing and Health Sciences, Simmons College, Boston, MA 02115, USA.

Acknowledgements

We thank Sarah Pehrah for assistance with RDT DNA extractions. We thank the sample collection teams in both Senegal and Comoros (J. Ndiaye, Y. Dledhloa, A. Mbeye, A. Deme, M. Ndiaye, D. Diop, O. Sarr, A.S. Fanzil, M.A. Maamoune, M.M. Toyb). We also thank Iguosadolo Nosamiefan for critical reading of the manuscript. The work was supported by funding from the Bill and Melinda Gates Foundation, the Harvard Global Health Institute, and from the International Centers of Excellence for Malaria Research, West Africa (U19AI069606).

Compliance with ethical guidelines

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 28 May 2015 Accepted: 23 August 2015

Published online: 29 September 2015

References

- World Malaria Report 2013. World Health Organization, 2013. (http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/).
- Chopi L, Boderle M, Gillet P, van Esbroeck M, Jacobs J. Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time-PCR. *Malar J* 2011;10:67.
- Ishengoma DS, Lwitlho S, Madebe RA, Nyagonda N, Persson O, Vestergaard LS, et al. Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence. *Malar J* 2011;10:6.
- Morris U, Aydin-Schmidt B, Shakey D, Martensson A, Jamnagere L, Ali AS, et al. Rapid diagnostic tests for molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* malaria: assessment of DNA extraction methods and field applicability. *Malar J* 2013;12:106.
- Veron V, Carme B. Recovery and use of *Plasmodium* DNA from malaria rapid diagnostic tests. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(94):3.
- Dillaro P, Nevill C, Le Bras J, Ringwald P, Musiano P, Garner P, et al. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet*. 1996;348:1196–201.

7. White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Maish K, Snow RW, et al. Averting a malaria disaster. *Lancet*. 1999;353:1965–7.
8. Yuthavong Y. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes Infect*. 2002;4:175–82.
9. Al-Ebasi I, Khalil IF, Elbashi M, Masuadi EM, Bygbjerg JC, Alfrangis M, et al. High frequency of *Plasmodium falciparum* C1CN1/S1GEAA and CVIET haplotypes without association with resistance to sulfadoxine/pyrimethamine and chloroquine combination in the Daraweesh area, in Sudari. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:725–32.
10. Das S, Chakraborty SP, Hatt A, Roy S. Malaria treatment failure with novel mutation in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (*pfhfr*) gene in Kolkata, West Bengal, India. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:447–51.
11. Mombo-Ngomu G, Gyakwirime S, Ord R, Gabor JJ, Greutelsers KC, Proffanter K, et al. High prevalence of *dhfr* triple mutant and correlation with high rates of sulphadoxine-pyrimethamine treatment failures in vivo in Gabonese children. *Malar J*. 2011;10:123.
12. Ndjounga M, Tahar R, Basco LK, Cosimiro PN, Malonga DA, Ntsumi F. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year-olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health*. 2007;12:1164–71.
13. Wang R, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, et al. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;89:161–77.
14. Faye B, Ndiaye M, Ndiaye JL, Annie A, Tine RC, Lo AC, et al. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during the intermittent preventive treatment in infants coupled with the expanded program immunization in Senegal. *Parasitol Res*. 2011;109:133–8.
15. Henry M, Diallo I, Bordes J, Ka S, Pradines B, Clotta B, et al. Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:146–51.
16. Ndiaye D, Dally JF, San O, Ndir O, Gaye O, Mboup S, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health*. 2005;10:1176–9.
17. Ndiaye M, Tine R, Faye B, Ndiaye JL, Lo AC, Sylla R, et al. Selection of anti-malarial drug resistance after intermittent preventive treatment of infants and children (IPTi/c) in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:1134–9.
18. Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Sène PD, Sabeti PC, et al. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:2976–86.
19. Ndiaye D, Diéy B, Ndiaye YD, Vah Tyne D, Daniels R, Bel AK, et al. Polymorphism in *dhfr/dhps* genes, parasite density and ex vivo response to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria parasites in Thies, Senegal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2013;3:135–42.
20. Rebaudet S, Bogreau H, Sita R, Lepere JF, Bertaux L, Pradines B, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* and elimination of malaria, Comoros Archipelago. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1686–94.
21. Randrianavelojosa M, Baherinjaly RH, Migiani R, Mercereau-Pujalon O, Aney F, Bedja SA. *Plasmodium falciparum* resistant to chloroquine and to pyrimethamine in Comoros. *Parasite*. 2004;11:419–23.
22. Tall A, Rabarjaona LJ, Robert V, Bedja SA, Aney F, Randrianavelojosa M. Efficacy of artesunate plus amodiaquine, artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine, and chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* in the Comoros Union. *Acta Trop*. 2007;102:176–81.
23. Mouchet J, Carnevale R, Coosemans M, Julvez J, Manquin S, Richard-Lenoir O, et al. Biodiversité du paludisme dans le monde. Paris: John Libbey Eurotext; 2004.
24. Ndiaye D, Patel V, Demas A, LeRoux M, Ndir O, Mboup S, et al. A non-radioactive DAPI-based high-throughput in vitro assay to assess *Plasmodium falciparum* responsiveness to antimalarials—increased sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:328–30.
25. Snounou G, Zhu X, Spillboom N, Jara W, Thaitong S, Brown KN, et al. Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variant in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93:369–74.
26. Parola P, Pradines B, Simon F, Carlotto MP, Minder P, Ranjeva MP, et al. Antimalarial drug susceptibility and point mutations associated with drug resistance in 248 *Plasmodium falciparum* isolates imported from Comoros to Marseille, France, 2004–2007. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:431–7.
27. Andrianantsonirina V, Ratsimbazoa A, Bouchier C, Jahevitra M, Rabearimanana S, Radrianjaly R, et al. *Plasmodium falciparum* drug resistance in Madagascar: facing the spread of unusual *pfhfr* and *pfmdr-1* haplotypes and the decrease of dihydroartemisinin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4588–97.
28. RPP. Revue de la Performance du Paludisme dans l'union des Comores, rapport non publié 2011.
29. Angiarek X. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in sub-Saharan Africa. *Lancet*. 2001;358:1027–8.
30. Whitty CJ, Jaffar S. *Plasmodium falciparum* cross resistance. *Lancet*. 2002;359:80.
31. Talisuna AO, Nalunkuma-Kazibwe A, Langi J, Mutabingwa TK, Watkins WW, Von Marck E, et al. Two mutations in dihydrofolate reductase combined with one in the dihydropteroate synthase gene predict sulphadoxine-pyrimethamine parasitological failure in Uganda children with uncomplicated *falciparum* malaria. *Infect Genet Evol*. 2004;4:321–7.
32. McCollum AM, Schneider KA, Griffing SM, Zhou Z, Kariuki S, ter-Kuile F, et al. Differences in selective pressure on *dhps* and *dhfr* drug resistant mutations in western Kenya. *Malar J*. 2012;11:77.
33. World Health Organization. Report of the technical consultation on intermittent preventive treatment in infants (IPTi), technical expert group on preventive chemotherapy. Geneva: World Health Organization; 2009. p. 1–11.
34. WHO. Policy recommendation on Intermittent Preventive Treatment during Infancy with sulphadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for *Plasmodium falciparum* Malaria control in Africa. Geneva: World Health Organization; 2010.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access



Temporal changes in *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 2b (*PfRh2b*) in Senegal and The Gambia

Cyrille K. Diédhiou^{1,2}, Rahama A. Moussa¹, Amy K. Bei^{2,3,4}, Rachel Daniels³, Nasseridine Papa Mze^{1,2}, Daouda Ndiaye⁴, Ngor Faye⁵, Dyann Wirth³, Alfred Amambua-Ngwa⁶, Souleymane Mboup¹ and Ambroise D. Ahouidi^{1,2*} 

Abstract

Background: The *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 2b (*PfRh2b*) is an important *P. falciparum* merozoite ligand that mediates invasion of erythrocytes by interacting with a chymotrypsin-sensitive “receptor Z”. A large deletion polymorphism is found in the c-terminal ectodomain of this protein in many countries around the world, resulting in a truncated, but expressed protein. The varying frequencies by region suggest that there could be region specific immune selection at this locus. Therefore, this study was designed to determine temporal changes in the *PfRh2b* deletion polymorphism in infected individuals from Thiès (Senegal) and Western Gambia (The Gambia). It was also sought to determine the selective pressures acting at this locus and whether prevalence of the deletion in isolates genotyped by a 24-SNP molecular barcode is linked to background genotype or whether there might be independent selection acting at this locus.

Methods: Infected blood samples were sourced from archives of previous studies conducted between 2007 and 2013 at SLAP clinic in Thiès and from 1984 to 2013 in Western Gambia by MRC Unit at LSHTM, The Gambia. A total of 1380 samples were screened for the dimorphic alleles of the *PfRh2b* using semi-nested Polymerase Chain Reaction PCR. Samples from Thiès were previously barcoded.

Results: In Thiès, a consistent trend of decreasing prevalence of the *PfRh2b* deletion over time was observed: from 66.54% in 2007 and to 38.1% in 2013. In contrast, in Western Gambia, the frequency of the deletion fluctuated over time; it increased between 1984 and 2005 from (58.04%) to (69.33%) and decreased to 47.47% in 2007. Between 2007 and 2012, the prevalence of this deletion increased significantly from 47.47 to 83.02% and finally declined significantly to 57.94% in 2013. Association between the presence of this deletion and age was found in Thiès, however, not in Western Gambia. For the majority of isolates, the *PfRh2b* alleles could be tracked with specific 24-SNP barcoded genotype, indicating a lack of independent selection at this locus.

Conclusion: *PfRh2b* deletion was found in the two countries with varying prevalence during the study period. However, these temporal and spatial variations could be an obstacle to the implementation of this protein as a potential vaccine candidate.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *PfRh2b*, SNPs, Senegal, Gambia

*Correspondence: ambroise.ahouidi@ressef.org

¹Institute for Health Research, Epidemiological Surveillance and Training (RESSEF), Dakar, Senegal

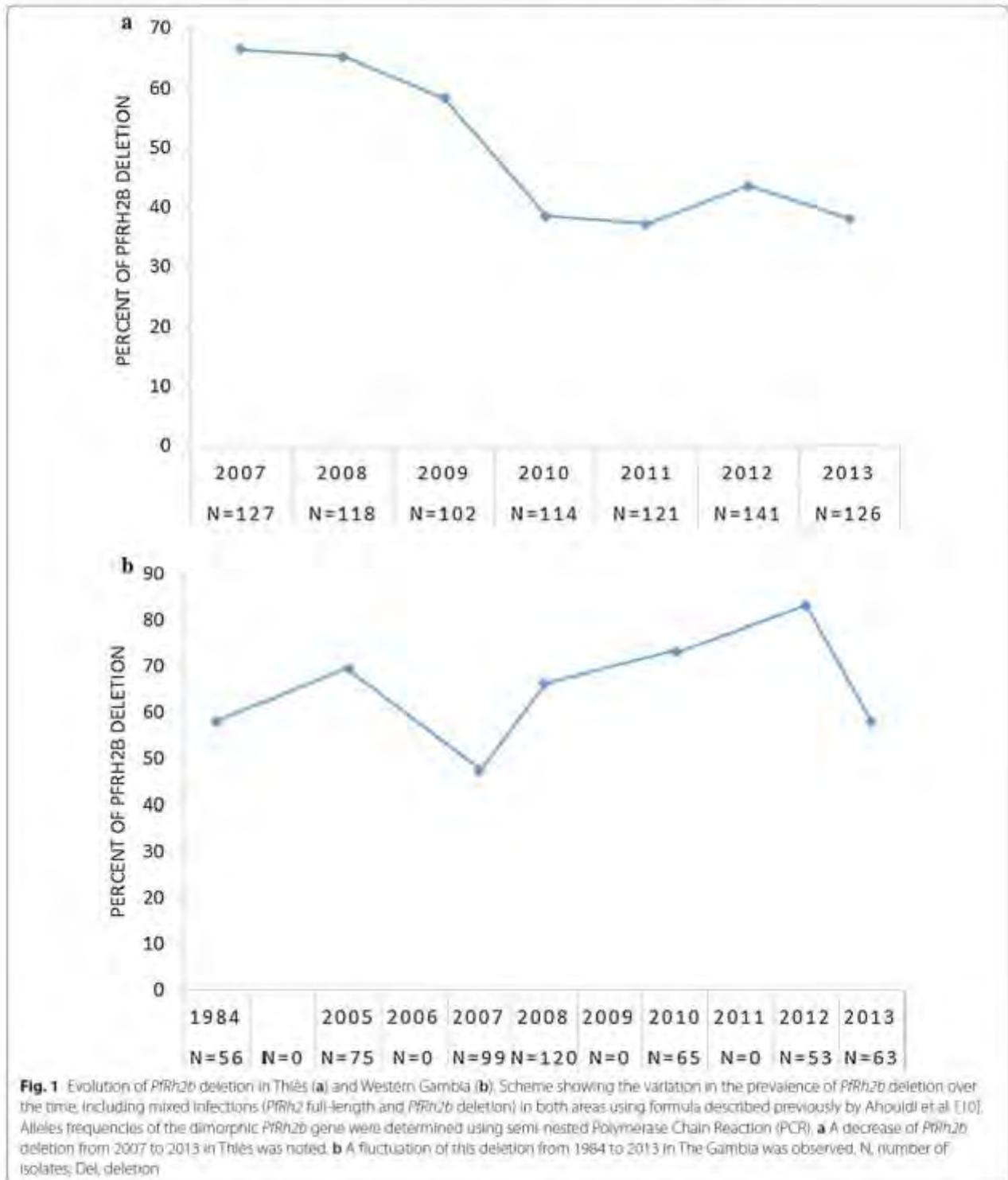
Full list of author information is available at the end of the article.



Background

Despite significant efforts and progress directed towards malaria prevention and control, malaria from *Plasmodium falciparum* parasite infection remains a major

global health challenge. This is due to multiple factors, including insecticide resistance in anopheline vectors, the emergence and rapid spread of drug-resistant parasite strains and especially the lack of an effective vaccine.



Therefore, the development of an effective malaria vaccine remains critical for malaria eradication. However, efforts at developing a malaria vaccine have been hampered by the extensive genetic diversity in malaria parasite populations and allele specific immunity in endemic human populations [1, 2].

Characterization of genetic polymorphisms in key vaccine antigens of *P. falciparum* will enable a better understanding of the molecular evolution of parasite populations that could affect efficacy of future vaccines [3]. *Plasmodium falciparum* Reticulocyte binding protein homologues (PfRh) are expressed at the apical surface of invasive merozoite [4–7] and are believed to play a role in the recognition of the erythrocyte and in tight junction formation [8]. Towards design of a vaccine, several studies are looking at the immunity and diversity of the PfRh family of proteins [6, 8–13]. There are five functional *PfRh* genes: *P. falciparum* Reticulocyte-binding protein homolog 1 (*PfRh1*) [14, 15], *PfRh2a*, *PfRh2b* [16–18], *PfRh4* [19, 20], and *PfRh5* [21–23]. Two members of the *P. falciparum* Rh ligands, PfRh2a and PfRh2b, are important mediators of parasite invasion. PfRh2b mediates invasion by interacting with a chymotrypsin-sensitive erythrocyte receptor Z [24]. These proteins are currently being assessed as invasion-blocking vaccine candidates [11, 25]. However, they differ structurally at the c-terminal.

The c-terminal region of *PfRh2b* gene presents a large structural polymorphism (0.58 kb) and this was found at high frequencies in field isolates from different areas of Africa [10, 26, 27]. The prevalence of this deletion was characterized for the first time in 2006 in parasite populations from different areas [10]. However, the prevalence and evolution of the PfRh2b protein as malaria declines remains unknown. Understanding the changes over time in the frequencies of allelic variants in potential vaccine candidate will be important, as these changes could affect the efficacy of a candidate vaccine. Therefore, it is important to assess temporal changes in the *PfRh2b* gene and prevalence of the dimorphic alleles *PfRh2b* deletion (*PfRh2b~~del~~*) over time in endemic populations.

As shown for Thiès, in Senegal, neutral single nucleotide polymorphism (SNP) markers can sensitively determine temporal changes in *P. falciparum* genotypic diversity [28]. There are extensive hotspots of diversity across the genome, mostly within genes exposed on the surface of the parasite and erythrocyte, including invasion ligands. These ligands are a target of immune responses and remain a major focus for development of a blood stage vaccine [29, 30].

As the frequency of genotypes changes as well as the *PfRh2b* alleles, the prevalence of the deletion was determined using molecular barcode to examine whether

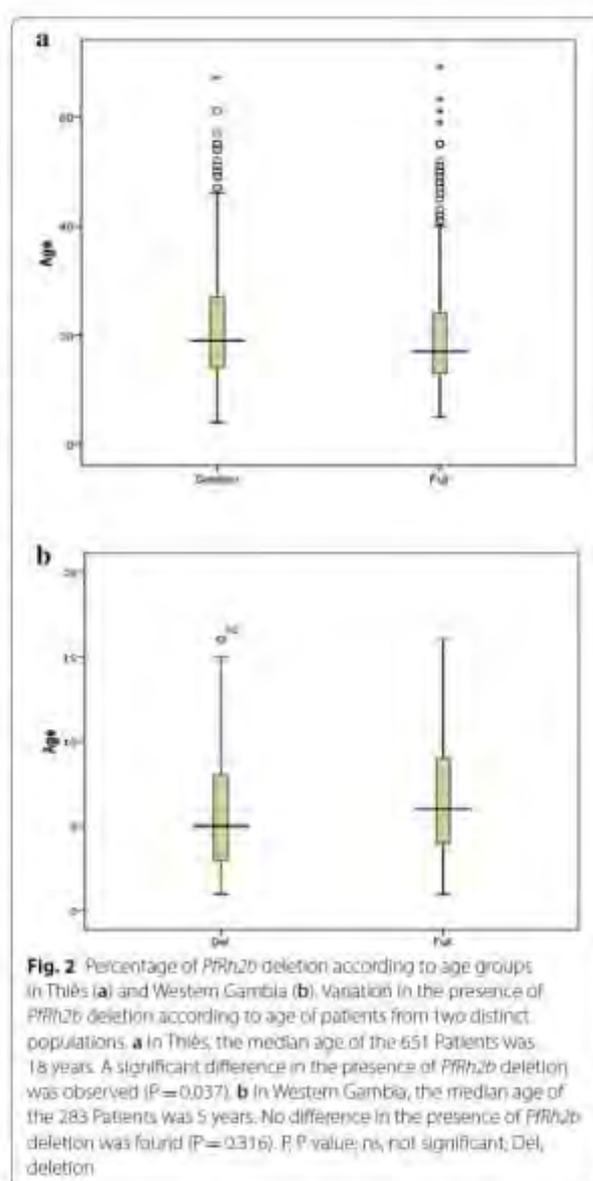


Fig. 2 Percentage of *PfRh2b* deletion according to age groups in Thiès (a) and Western Gambia (b). Variation in the presence of *PfRh2b* deletion according to age of patients from two distinct populations. **a** In Thiès, the median age of the 651 Patients was 18 years. A significant difference in the presence of *PfRh2b* deletion was observed ($P=0.037$). **b** In Western Gambia, the median age of the 283 Patients was 5 years. No difference in the presence of *PfRh2b* deletion was found ($P=0.316$). P, P value; ns, not significant; Del, deletion

allelic frequencies are strictly related to barcode haplotype clusters or independent selection at the *PfRh2b* locus could be driving frequencies in the population. This provides data relevant for further consideration of PfRh2b and other structurally variant proteins as targets for vaccine development.

Methods

Study sites and *Plasmodium falciparum* field isolates

Archived *P. falciparum* DNA samples from infected blood samples of consenting individuals were sourced from previous studies conducted between 2007 and 2013 at the Service de Lutte Anti-Parasitaire (SLAP) clinic in

Thiès (70 km from Dakar, the capital city of Senegal) and from 1984 to 2013 in Western Gambia. Overall, malaria prevalence is moderate in The Gambia with high seasonal transmission [31, 32]. In contrast, Thiès is characterized by a perennial hypo-endemic transmission. These studies had received ethical approval from the Institutional Review Boards of the Harvard School of Public Health, the Ethics Committee of the Ministry of Health in Senegal and the Joint Gambian Government/MRCG Ethics Committee. A total of 1380 (849 from Thiès and 531 from Western Gambia) *P. falciparum* malaria infected blood samples were analysed. Among the Thiès samples, 580 that has been previously genotyped using a molecular barcode of 24 SNPs by Daniels et al. [33] were used for determining the association between alleles of *PfPrh2b* and the specific barcode of parasite.

PfPrh2b genotyping

Semi-nested PCR method, as described previously [10], was used to amplify an *PfPrh2b* gene fragment including the deletion in all extracted DNA samples. A positive control (*P. falciparum* laboratory cloned line 3D7) and negative control (reagent grade water) were included in all PCR amplifications. The size of the PCR products was estimated using Gene Ruler 100 bp DNA ladder marker (Quick Load®, 100pb DNA Ladder).

Statistical analysis

For continuous variables median and interquartile range were calculated, while for categorical variables, the

proportion or prevalence of the outcome with 95% CI was calculated.

For each year, to take into account the prevalence in mixed genotype isolates, the prevalence of *PfPrh2b* full-length and *PfPrh2b* deletion was calculated as follows:

(number of *PfPrh2b* allele isolates + (0.5 × number of mixed isolates))/total number of isolates [10]. The Chi square linear trends was used to determine if the differences in frequency over the years was statistically significant. Differences between groups were assessed using Mann-Whitney U-test. Wright's fixation index (*Fst*) was also calculated to assess the extent of genetic differentiation of *PfPrh2b* polymorphism in Thiès and Western Gambia over time.

Results

Evolution of the prevalence of *PfPrh2b* deletion in fields isolates from Thiès and Western Gambia

In Thiès, the prevalence of the deletion decreased significantly from 66.54% in 2007 to 38.1% in 2013 ($P < 0.0001$). This decline was not homogeneous with the presence of a peak in 2012, where *PfPrh2bdel* form was present in 43.62% of infections (Fig. 1a).

In Western Gambia, temporal variation in prevalence in *PfPrh2b* deletion was observed between 1984 and 2013. The prevalence of *PfPrh2b* deletion increased between 1984 and 2005 from (58.04%) to (69.33%) ($P = 0.03$). From 2005 to 2007 there was a decline of the deletion to (47.47%) ($P = 0.004$). Between 2007 and 2012, the prevalence of this deletion increased significantly from 47.47 to 83.02% ($P = 0.00005$) and finally declined significantly to 57.94% in 2013 ($P = 0.001$) (Fig. 1b). Since mixed

Table 1. Allele frequencies used to calculate *Fst* according to years

Years	THIES			WESTERN GAMBIA		
	<i>PfPrh2bdel</i>	<i>PfPrh2bfull</i>	Gene diversity (h)	<i>PfPrh2bdel</i>	<i>PfPrh2bfull</i>	Gene diversity (h)
1984	–	–		0.58	0.42	0.487
2005	–	–		0.69	0.31	0.428
2007	0.67	0.33	0.442	0.47	0.53	0.498
2008	0.65	0.35	0.455	0.66	0.34	0.449
2009	0.58	0.42	0.487	–	–	–
2010	0.39	0.61	0.372	0.73	0.27	0.394
2011	0.37	0.63	0.468	–	–	–
2012	0.43	0.56	0.493	0.83	0.17	0.282
2013	0.38	0.62	0.477	0.56	0.42	0.487
Average	0.492	0.503	0.455	0.648	0.351	0.432
	<i>Fst</i> = 0.05			<i>Fst</i> = 0.057		

Temporal differentiation of *PfPrh2b* polymorphism in Thiès and Western Gambia populations. *Fst* value was calculated to assess the extent of temporal variation in the frequencies of *PfPrh2b* alleles in both areas. The overall estimated value of *Fst* from 2007 to 2013 in Thiès was 0.09. In Western Gambia the *Fst* value from 1984 to 2013 was 0.057

Fst, wright's fixation index; h, gene diversity

Table 2 Nucleotide sequence of haplotype clusters in Thiès

Haplotype cluster	Molecular barcodes	N (%)	N (isolats)	<i>PfRh2bdel</i> (%)	<i>PfRh2bfull</i> (%)
Haplotype cluster 36	CACTGCAGACCGCACCCGAAGCCTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 38	CACTCGAGATCGTCACCACGCTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 45	TATTCGGTCCGGTCCCTCGCTTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 51	TACTCCGGTTCGCACACAGACTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 49	TATTCGAAATCGCACCTAGATTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 48	TACTCCAGTCCATACACAGATTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 46	TACTGCAGATTGTACCCAAAAGCTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 37	CACTGCGGATTGTACCTAAGACTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 54	CGCTCCAGACTACACCCCTAAACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 55	TACTCCGGATTGTACCAAGACTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 59	TACTCCGGTTTATACCTTAGACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 61	TACCGGAGTCCGTACCTAAGCCTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 15	TACTCCGGTTCGTAAACTCGCCTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 63	TACTCCAGACCGCCCTAAAAGTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 9	TATTCAGATXGCAACTTCGACTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 62	TACTCGAGACTGCNCATACACTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 13	TACTCGAAACTXCCCATAAGCTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 68	TACCCCGGACCAACAATAAGACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 69	TACTGGGATCCGCACCTAAGACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 67	EACTCCGGATTGCCACTTAGATTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 70	TATTCGGACXACACACTAGCTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 22	TACTCCGGATCGCACCTTAGATTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 74	TACTCCAGACTATCCATTTCGATTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 71	CACTCCGGATTXCCAATAAGCTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 80	CATTCAGTCCXCCAATAAGATTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 72	TATTGGGGATCGCAACCAAGATTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 77	TACTGGAGTCCGTACCTTAGCTTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 97	CACTCGAAATXATACCTTAGCTTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 87	TACTCCGGTCTATAAATAAGACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 89	TACTCGAGTTTATACCTTAGACTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 92	TATTGCAGTCCXCAAATAAGCTTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 84	CACTCCAGTECACCACTAGATTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 96	TATTCAGACCGCACATTAGCCTG	0.345	2	50	50
Haplotype cluster 93	TACTCCAGTCCGTCACTTAGACTG	0.345	2	100	0
Haplotype cluster 44	TACTCCAGACTACAACCTAGCCTG	0.345	2	0	100
Haplotype cluster 43	TATTCAGATTGCAACTTCGCCTG	0.517	3	100	0
Haplotype cluster 58	CACTCGAGTXXACAACCTAGCCTG	0.517	3	33	67
Haplotype cluster 7	CACTCCGGATTGCCACTAAGATTG	0.517	3	33	67
Haplotype cluster 19	TATTCGAGTCTACACCTTCACTTG	0.517	3	100	0
Haplotype cluster 21	TACCCCGGTCCACCACTAAAAGTTG	0.517	3	0	100
Haplotype cluster 23	CACCCGAGTECACCAACAAGACTG	0.517	3	0	100
Haplotype cluster 95	CAECCCGAATCXACCTAAGACTG	0.517	3	0	100
Haplotype cluster 99	TACTCCGAAGTGCACATTAGATTG	0.517	3	100	0
Haplotype cluster 55	TACTCCGGTTTCGCACACAGACTG	0.69	4	100	0
Haplotype cluster 64	TACTCGAGATXATACATACACTTG	0.69	4	0	100
Haplotype cluster 10	CATTGGGATCTGCACCTAAAAGCTG	0.69	4	100	0
Haplotype cluster 24	CATTECAGTCCXCCCTTAGATTG	0.69	4	25	75
Haplotype cluster 81	TACTCCAGATCGCACCCAAAGCCTG	0.69	4	75	25
Haplotype cluster 98	CACTCGAGTTTACAACCTAAGATTG	0.69	4	25	75

Table 2 (continued)

Haplotype cluster	Molecular barcodes	N (%)	N (isolats)	<i>PfRh2bdel</i> (%)	<i>PfRh2bfull</i> (%)
Haplotype cluster 5	TACTCGAACTGCCCATAGCTTG	0.89	4	0	100
Haplotype cluster 85	CACTCCAAATCGTACCTTAGATTG	0.862	5	100	0
Haplotype cluster 8	TACCCCGGTCCACACCTTAACTTG	0.862	5	100	0
Haplotype cluster 11	TACTCGAGATCATACTACTTG	0.862	5	0	100
Haplotype cluster 12	CACTCGGATCTGCAACCTAAACTG	0.862	5	100	0
Haplotype cluster 6	CATTCAGTCCGCCAATAAGATTG	1.034	6	0	100
Haplotype cluster 26	CACTCCAGTCCGTCACCAAGATTG	1.034	6	17	83
Haplotype cluster 17	TACCCCGGTCCACCAATAAGATTG	1.207	7	0	100
Haplotype cluster 16	TACTCCAGATTACAACCTAGCCTG	1.207	7	100	0
Haplotype cluster 66	TGTTCCAGTTTATCACCACGCCTG	1.379	8	12.50	87.50
Haplotype cluster 18	TATTCCAGTCCACCCATAAGAETG	1.552	9	89	11
Haplotype cluster 4	TACTCCGGTTXGCACACACGACTG	2.586	15	100	0
Haplotype cluster 29	TACCCCGGTCCACCAATAAGACTG	7.241	42	9.50	90.50
	UNIQUES	88.27	388	49.11	50.89

N, number of isolates; *PfRh2bdel*, deletion present; *PfRh2bfull*, full-length sequence

infections are uncommon in endemic populations, the frequency of infections with both deleted and full-length parasites (mixed) was determined. The result was highest in 2007 (0.10) and lowest in 2009 (0.02) in Thiès. In Western Gambia, mixed infections were most common in the earliest population from 1984 (0.23) and lowest in 2008 with (0.04) (Additional file 1: Table S1).

Overall, a significant decrease of the prevalence of *PfRh2b* deletion from 2007 to 2013 in Thiès ($P < 0.0001$) and fluctuating prevalence from 1984 to 2013 in Western Gambia were observed.

Prevalence of *PfRh2b* deletion according to age in Thiès and western Gambia

The presence of the deletion at high frequency in the general population and the acquisition of antibodies in an age-dependent manner against the c-terminal region of *PfRh2b* [10], have raised the interest to determine the prevalence of the deletion by age-group to see if the deletion would be more frequent in adults since they are long exposed. Thus, among the 1380 *Plasmodium* isolates assayed, 934 samples were available for age data and were analysed (651 from Thiès and 283 from Western Gambia). A median age was used to divide each population into two numerically equal groups.

In Thiès, since the study population mainly consists of adults (62%), the median age of the 651 patients was 18 years. Thus, the *PfRh2b* deletion form was less common in children compared to older patients (Fig. 2a). Using the Mann-Whitney U-test, a significant difference in the presence of *PfRh2b* deletion was found ($P = 0.037$), suggesting that there is an association between age and the presence of this deletion in Thiès.

In contrast, in Western Gambia, the population study is consisting of children (under 16 years of age); the median age of the 283 patients was 5 years. The *PfRh2b* deletion was more common in younger children compared to older children (Fig. 2b), but the difference is not significant by the Mann-Whitney U-test ($P = 0.316$).

Temporal differentiation of *PfRh2b* polymorphisms in Senegal and Gambia populations

Genetic diversity of the genes in natural parasites populations is a real obstacle for the validation of potential vaccine candidate. In this study, the degree of divergence to which *PfRh2b* gene is subject to selection was estimated by calculating *Fst* from the allelic frequencies of this locus according to years.

In Senegal the *Fst* value obtained from 2007 to 2013 was high (0.09), suggesting high degree of allelic divergence in this region over the time. In contrast, the *Fst* value obtained in The Gambia from 1984 to 2013 was low (0.057), suggesting less genetic differentiation of these alleles in this area over the time (Table 1).

Prevalence of *PfRh2b* in isolates grouped by molecular barcode

It has been observed by barcoding in Thiès that the parasite, having undergone various interventions and pressures, has adapted by evolving towards to a type of parasite [28]. It is also assumed that parasite, initially having the *PfRh2b* full-length, has adapted by presenting the deletion following the different pressures. To test the hypothesis that the parasite with *PfRh2b* deletion may be linked by specific cluster, the prevalence of *PfRh2b* deletion according to molecular barcode was determined.

Table 3 Frequency of the deletion over time within each cluster that contain only the deletion

Haplotype	Sample ID	Molecular identifier	Sample ID	Del	Full
Cluster 05	Tb 007.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 007.2010	1	0
	Tb 013.2010	AAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 013.2010	1	0
	Tb 107.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 107.2010	1	0
Cluster 04	Tb 124.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 124.2013	1	0
	Tb 127.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 127.2013	1	0
	Tb 007.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 007.2011	1	0
Cluster 12	Tb 010.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 010.2011	1	0
	Tb 061.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 061.2011	1	0
	Tb 055.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 055.2012	1	0
	Tb 212.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 212.2012	1	0
Cluster 01	Tb 124.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 124.2010	1	0
	Tb 027.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 027.2011	1	0
	Tb 028.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 028.2011	1	0
Cluster 03	Tb 116.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 116.2011	1	0
	Tb 038.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 038.2010	1	0
	Tb 076.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 076.2010	1	0
	Tb 179.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 179.2010	1	0
Cluster 06	Tb 011.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 011.2011	1	0
	Tb 077.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 077.2011	1	0
	Tb 099.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 099.2011	1	0
	Tb 038.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 038.2012	1	0
	Tb 043.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 043.2012	1	0
	Tb 061.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 061.2012	1	0
Cluster 08	Tb 098.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 098.2012	1	0
	Tb 123.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 123.2012	1	0
	Tb 100.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 100.2012	1	0
Cluster 09	Tb 171.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 171.2008	1	0
	Tb 148.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 148.2008	1	0
Cluster 09	Tb 151.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 151.2013	1	0
	Tb 154.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 154.2013	1	0
Cluster 09	Tb 173.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 173.2013	1	0
	Tb 191.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 191.2013	1	0
	Tb 213.2013	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 213.2013	1	0
Cluster 03	Tb 145.2009	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 145.2009	1	0
	Tb 151.2009	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 151.2009	1	0
Cluster 01	Tb 042.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 042.2008	1	0
	Tb 071.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 071.2008	1	0
Cluster 15	Tb 044.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 044.2008	1	0
	Tb 101.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 101.2008	1	0
	Tb 105.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 105.2008	1	0
	Tb 210.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 210.2008	1	0
Cluster 4	Tb 004.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 004.2008	1	0
	Tb 014.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 014.2008	1	0
	Tb 016.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 016.2008	1	0
	Tb 063.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 063.2008	1	0
	Tb 081.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 081.2008	1	0
	Tb 095.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 095.2008	1	0
	Tb 112.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 112.2008	1	0
	Tb 120.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 120.2008	1	0
	Tb 173.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 173.2008	1	0
	Tb 188.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 188.2008	1	0
Cluster 40	Tb 143.2007	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 143.2007	1	0
	Tb 149.2007	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 149.2007	1	0
	Tb 155.2007	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 155.2007	1	0
	Tb 108.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 108.2010	1	0
	Tb 149.2010	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 149.2010	1	0
	Tb 001.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 001.2008	1	0
	Tb 003.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 003.2008	1	0
	Tb 070.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 070.2008	1	0
Cluster 02	Tb 000.2008	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 000.2008	1	0
	Tb 075.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 075.2012	1	0
Cluster 06	Tb 152.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 152.2012	1	0
	Tb 001.2007	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 001.2007	1	0
Cluster 19	Tb 011.2007	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 011.2007	1	0
	Tb 121.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 121.2011	1	0
	Tb 140.2011	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 140.2011	1	0
Tb 175.2012	GAATTTGAAAAGTATTAATTAAGATTTG	Tb 175.2012	1	0	

Among the samples that were analysed for *PfPrh2b* polymorphism, 580 from Thiès had been previously genotyped using the 24-SNP barcode [33] and the results were classified into two groups: a group named "cluster" which includes the samples having similarities with at least one other isolate in their nucleotide sequences and a group called "unique" grouping parasites with unique SNP

barcode. 41.73% (242/580) of samples belonged to the cluster-group and 58.27% (338/580) were in the unique group (Table 2).

No significant difference in the frequency of *PfPrh2b* deletion between the cluster-group and the unique group was found ($P=0.5014$). Among the 338 isolates having unique barcodes, 166 (49.11%) had the deletion and 172 (50.89%) had the full-length fragment of *PfPrh2b* gene. Therefore, both alleles *PfPrh2b* deletion and *PfPrh2b* full-length, had a similar distribution within the unique genotype group. Furthermore, all the 242 isolates belonging to the cluster-group were also tested to assess the frequency of *PfPrh2b* alleles. In this group, 62 distinct subgroups were identified. The results showed that 20 haplotype clusters had only the deletion variant of *PfPrh2b* gene, 24 subgroups had only the full-length fragment and the remaining 18 subgroups were parasites having the deletion and full-length (Table 2).

The number of samples is differently distributed in each of the 20 haplotype clusters with the deletion, and this distribution varies also over time (Table 3). Evolution over time of the 20 haplotype clusters containing only the *PfPrh2b* deletion shows a decrease of the prevalence between 2008 and 2010 as well as a slight increase between 2010 and 2013 (Fig. 3). Since the numbers in the majority of the cluster group with the *PfPrh2b* deletion are limited, haplotypes with $n > 5$ were examined further (haplotype 4 and 16) (Fig. 4). Haplotype cluster 4 with the deletion was found in 2008 ($n = 12$) and 2009 ($n = 3$), but not in the other years. Meanwhile, haplotype cluster 16 with the deletion was present in 2011 ($n = 1$), and 2012 ($n = 6$), but not in the other years (Fig. 5). The analysis of the results over time suggests that the frequency of *PfPrh2b* deletion is related to the presence of some haplotype clusters in this population.

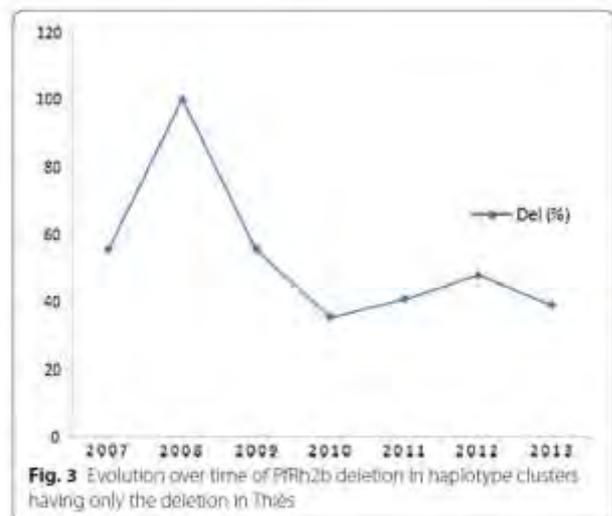


Fig. 3 Evolution over time of *PfPrh2b* deletion in haplotype clusters having only the deletion in Thiès



(See figure on next page.)

Fig. 4 Percentage of isolates of cluster-group and unique based on *PfPrh2b* polymorphism in Thiès. Scheme showing the association between the polymorphism of *PfPrh2b* gene and specific barcode of parasite. "Haplotype clusters" which had $n=4$ samples were represented. Haplotype cluster 55; 10; 65; 8; 12; 16 and 4 had only the deletion of *PfPrh2b* gene (Blue pie chart); Haplotype cluster 64; 5; 11; 6 and 17 had only the full-length fragment (orange pie chart). The remaining (Haplotype cluster 24; 31; 98; 26; 66; 18 and 29) were parasites having deletion and full-length alleles. The last pie chart (with $n=338$) represented the parasites with unique barcode. Del, deletion; Full, full-length sequence; n , number of isolates

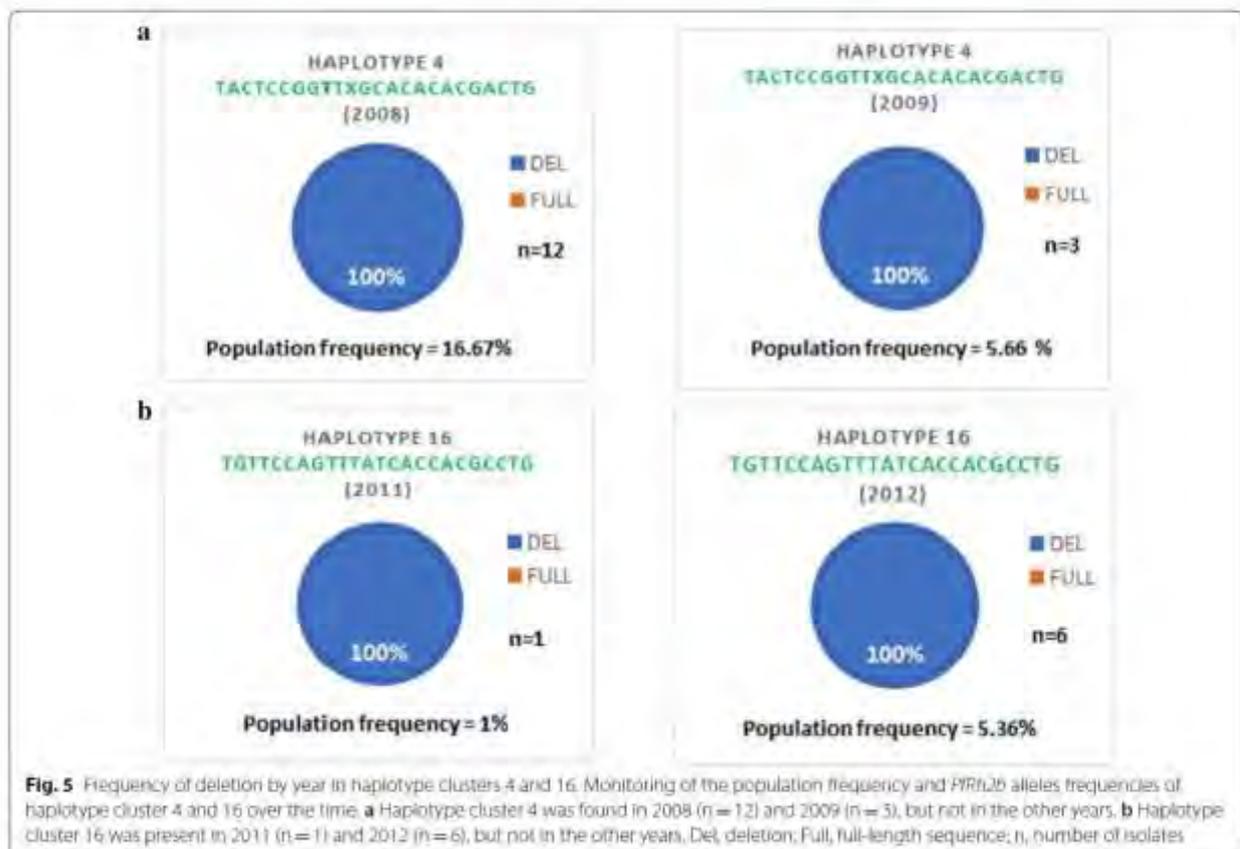
Discussion

Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homolog 2b (*PfPrh2b*), has been reported to present a large structural polymorphism (0.58 kb deletion) in the c-terminal region. It is an important target of immunity [10] and could be considered as a potential candidate for blood stage vaccine development. Previous works showed that *PfPrh2b* deletion was highly prevalent in isolates from Senegal and Africa [10, 26, 27] and present in different populations of the world [10]. However, malaria prevalence has been declining and interventions are taking place across sub-Saharan Africa. As these may be selecting for parasite subtypes, the changes imposed on this *PfPrh2b* protein remains unknown. Therefore, the goal of this study was to follow the temporal evolution of the prevalence of *PfPrh2b* deletion using samples from

2007 to 2013 in Thiès and from 1984 to 2013 in Western Gambia.

For the two populations, the prevalence of the deletion variant of *PfPrh2b* ranged from 30 to 80%. However, while the prevalence of this deletion declined in Senegal, there was a steady increase in the Gambian populations studied until 2012. The differences in the trends between the two countries and within each country can be the result in random shifts in parasite allele frequencies in different geographic region due to genetic drift in isolated populations. Other explanations could be the genetic background of the host, the environmental modification, immune pressure, drug pressure and or drug resistance [28, 34].

Furthermore, the prevalence of *PfPrh2b* deletion in different age groups in Thiès showed that the deletion was



significantly less present in children compared to older patients. In Western Gambia, the prevalence of *PfPrh2b* deletion was more common in younger children compared to older children, but the difference is not significant. With those results observed in these two sites, the association between age and deletion is not clear. However, a previous study did not find a relation between age and deletion [10].

Moreover, the evaluation of temporal variation of *PfPrh2b* polymorphism in Senegal and Gambia populations was performed by using *Fst* to estimate the degree by which this locus is subject to a selection. Indeed, selection intensity can lead to differences in diversity and generate divergence among natural populations.

Thus, the *Fst* value (0.09) in Thiès, from 2007 to 2013 is higher than those observed for *PfPrh2b*, *Msp2*, *EBA 175* and *Pfs48/45* within Senegal and between African countries [10]. However, this *Fst* value was lower than those observed for *Msp2* and *EBA 175* dimorphisms, which has been reported to exhibit less genetic differentiation and possible balancing selection in the global populations (African, South East Asian and Latin American populations) [10]. In Western Gambia, the *Fst* value was low and similar to that observed for the *EBA 175* dimorphism within Senegal, which has been shown to have also minimal genetic differentiation globally [10]. Overall, the *Fst* values obtained in this study indicate less genetic differentiation suggesting that *PfPrh2b* polymorphism is under balancing selection over time in Thiès and Western Gambia.

Additionally, the prevalence of *PfPrh2b* deletion according to the molecular barcode of isolates from Thiès was analysed to determine whether the deletion is associated with a specific barcode in this region. Analysis of the distribution of *PfPrh2b* polymorphism in shared barcode clusters suggests that deletion is associated at some haplotype clusters in the population. However, the removal of large clusters from the population do not effect the prevalence of the deletion over time. The results of the study provide information on the genetic diversity of the *PfPrh2b* gene that could be useful in the validation of this antigen as a potential vaccine candidate.

Conclusion

Temporal trends in the frequency of the deleted *PfPrh2b* variant differed in Senegal and The Gambia. This may suggest an effect of local factors on the prevalence of *PfPrh2b* deletion between the years. Changes in the frequency of *PfPrh2b* polymorphism over the time could be an obstacle to the implementation of this protein as a potential vaccine candidate as allele specific immunity may affect its efficacy. It will be important to investigate the natural antibodies responses against *PfPrh2b* over the

time in different malaria endemic countries to evaluate this antigen as a vaccine candidate.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Number of samples by year of *PfPrh2b* polymorphism in Thiès and Western Gambia. Column N shows the number of samples analysed. n = the number of samples of each allele. *PfPrh2b-def* = deletion present; *PfPrh2b-full* = full-length sequence; *Mix* = *PfPrh2bDel/PfPrh2bfull*.

Abbreviations

PfPrh2b: *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 2b; *PfPrh2bdef*: *PfPrh2b* deletion; *PfPrh2bfull*: *PfPrh2b* full-length; DBL: Duffy binding-like family; SNPs: single nucleotide polymorphisms; SLAP: Service de Lutte Anti-parasitaire; MRC: Medical Research Council; DNA: deoxyribonucleic acid; PCR: polymerase chain reaction.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the sample collection team at the MRC The Gambia unit. Authors are grateful to the sample collection team at the SLAP. We thank also Abdou Salam Sall and Ousmane Diouf for their help with statistical analysis.

Authors' contributions

CRD performed experiments, analysed the data and wrote the manuscript. RAM performed experiments and analysed data. ADA designed and supervised the study, edited and reviewed the manuscript. AKB designed the study, contributed to the analyses of data, and reviewed the manuscript. AAN, RFD and NPM contributed to the analyses of data and reviewed the manuscript. DFW, DN, NF and SM reviewed final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The research was supported by funding from European Research Council (AdG-2011-294428) and a Bill and Melinda Gates foundation grant to D.F.W.

Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are included within the article.

Ethics approval and consent to participate

These studies were approved by the Institutional Review Boards of the Harvard School of Public Health, the Ethics Committee of the Ministry of Health in Senegal and the Joint Gambian Government/MRC Ethics Committee. Written informed consent was obtained directly from adult subjects and from parents or other legal guardians of all participating children.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from all enrolled patients for publication of this study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute for Health Research, Epidemiological Surveillance and Training (IRESSEF), Dakar, Senegal. ²Laboratory of Bacteriology and Virology, Hospital Aristide Le Dantec, 7325, Dakar, Senegal. ³Department of Immunology & Infectious Diseases, Harvard TH Chan School of Public Health, 665 Huntington Avenue, Boston, MA, USA. ⁴Laboratory of Parasitology Mycology, Aristide Le Dantec Hospital, Faculty of Medicine and Pharmacy, Cheikh Anta Diop University, 5005, Dakar, Senegal. ⁵Faculty of Sciences and Technologies, University Cheikh Anta Diop, Dakar, PO Box 5005, Dakar, Senegal. ⁶Medical Research Council Unit, The Gambia at LSHTM, Fajara, Banjul, The Gambia.

Received: 9 January 2019 Accepted: 5 July 2019
Published online: 16 July 2019

References

1. Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saut A, et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase I-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*. 2002;185:820–7.
2. Takala SL, Escalante AA, Branch OH, Kariuki S, Bowyer S, Chaiyaroj SC, et al. Genetic diversity in the Block-2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. *Infect Genet Evol*. 2006;6:417–24.
3. Neafsey DE, Juraska M, Bedford T, Benkeser D, Valim C, Griggs A, et al. Genetic diversity and protective efficacy of the RTS, S/AS01 malaria vaccine. *N Engl J Med*. 2015;373:2025–37.
4. Gurnian K, Gao X, Liew KJ, Preiser PR. Differences in erythrocyte receptor specificity of different parts of the *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 2a. *Infect Immun*. 2011;79:3421–30.
5. Sahar T, Bedzy KS, Bharadwaj M, Pandey AK, Singh S, Chitnis CE, et al. *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding-like homologue protein 2 (PFRH2) is a key adhesive molecule involved in erythrocyte invasion. *PLoS ONE*. 2011;6:e17102.
6. Persson KE, McCallum FJ, Reiling L, Lister NA, Stubbs J, Cowman AF, et al. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest*. 2008;118:342–51.
7. Dvornik JD, Bei AK, Coleman BI, Duraisingh MT. Functional diversification between two related *Plasmodium falciparum* merozoite invasion ligands is determined by changes in the cytoplasmic domain. *Mol Microbiol*. 2010;75:990–1006.
8. Thum WH, Heiler J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2012;28:23–30.
9. Dent AE, Bergmann-Leitner ES, Wilson DW, Tisch DJ, Kimmel R, Vulule J, et al. Antibody-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*: relationship to age and protection from parasitemia in Kenyan children and adults. *PLoS ONE*. 2008;3:e3557.
10. Ahouidi AD, Bei AK, Neafsey DE, Sari C, Volkman S, Milner D, et al. Population genetic analysis of large sequence polymorphisms in *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. *Infect Genet Evol*. 2010;10:200–6.
11. Reiling L, Richards JS, Fowkes FJ, Barry AE, Triglia T, Chokejindachai W, et al. Evidence that the erythrocyte invasion ligand PFRH2 is a target of protective immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Immunol*. 2010;185:6157–67.
12. Taylor HM, Grainger M, Holder AA. Variation in the expression of a *Plasmodium falciparum* protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infect Immun*. 2003;70:5779–89.
13. Bei AK, Membi CD, Rayner JC, Mubi M, Ngasala B, Sultan AA, et al. Variant merozoite protein expression is associated with erythrocyte invasion phenotypes in *Plasmodium falciparum* isolates from Tanzania. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:66–71.
14. Rayner JC, Vargas-Serato E, Huber CS, Galinski MR, Barnwell JW. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med*. 2001;194:1571–81.
15. Gao X, Yeo KP, Aw SS, Kuss C, Iyer JK, Genesan S, et al. Antibodies targeting the PFRH1 binding domain inhibit invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000104.
16. Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P, Barnwell JW. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelli* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:9648–53.
17. Triglia T, Thompson J, Casiana SR, Delorenzi M, Speed T, Cowman AF. Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to reticulocyte binding proteins in *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*. 2001;69:1084–92.
18. Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GL, et al. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*. 2003;22:1047–57.
19. Kaneko O, Mu J, Tsuboi T, Su X, Torii M. Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 2204Da protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;121:275–8.
20. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, et al. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*. 2005;309:1384–7.
21. Hayton K, Gaur D, Liu A, Takahashi J, Henschel B, Singh S, et al. Erythrocyte binding protein PFRH5 polymorphisms determine species-specific pathways of *Plasmodium falciparum* invasion. *Cell Host Microbe*. 2008;4:40–51.
22. Baum J, Chen L, Heiler J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5—an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2009;39:371–80.
23. Rodriguez M, Lustigman S, Montero E, Oksov Y, Lobo CA. PFRH5: a novel reticulocyte-binding family homolog of *Plasmodium falciparum* that binds to the erythrocyte, and an investigation of its receptor. *PLoS ONE*. 2008;3:e3300.
24. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124:755–66.
25. Triglia T, Chen L, Lopaticki S, Dekwadia C, Riglar DT, Hodder AN, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite invasion is inhibited by antibodies that target the PFRH2a and b binding domains. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002075.
26. Jennings CV, Ahouidi AD, Zilverenmit M, Bei AK, Rayner J, Sari C, et al. Molecular analysis of erythrocyte invasion in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Infect Immun*. 2007;75:3531–8.
27. Lantos PM, Ahouidi AD, Bei AK, Jennings CV, Sari C, Ndri G, et al. Erythrocyte invasion profiles are associated with a common invasion ligand polymorphism in Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 2009;136:1–9.
28. Daniels R, Chang HH, Sene PQ, Park DC, Neafsey DE, Schaffner SF, et al. Genetic surveillance detects both clonal and epidemic transmission of malaria following enhanced intervention in Senegal. *PLoS ONE*. 2013;8:e60760.
29. Richards JS, Beeson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol*. 2009;87:377–90.
30. Osei FH, Mackinnon MJ, Crosnier C, Fegan G, Kamuyu G, Waniguru M, et al. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med*. 2014;6:247ra102.
31. Betson M, Jawara M, Awolola TS. Status of insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae* s.l. from malaria surveillance sites in The Gambia. *Malar J*. 2009;8:187.
32. Caputo B, Nwakanma D, Jawara M, Adiamoh M, Dia I, Konate L, et al. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s. *Malar J*. 2008;7:182.
33. Daniels RF, Schaffner SF, Wenger EA, Proctor JL, Chang HH, Wong W, et al. Modeling malaria genomics reveals transmission decline and rebound in Senegal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:7067–72.
34. Le Bras J, Durand R. The mechanism of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:147–53.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Résumé

Le paludisme reste encore un défi majeur pour la santé mondiale. Pour contribuer à la lutte contre cette maladie, nous avons étudié les mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la SP et le polymorphisme du gène *PfRh2b* impliqué dans le processus de pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte. L'ADN parasitaire a été extrait à partir du sang total, du sang fixé sur papier filtre et des TDR. Le génotypage des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps* a été effectué par PCR-RFLP et HRM et celui du gène *PfRh2b* par PCR semi-nichée. Nous avons tout d'abord comparé les résultats de la HRM et ceux de la PCR-RFLP dans deux pays d'endémicités différentes (Sénégal et Tanzanie). Les deux techniques ont montré des prévalences élevées de mutations au niveau des gènes *Pfdhfr* (codons N51I, C59R et S108N) et *Pfdhps* (codon A437G). Aucune mutation n'a été détectée au niveau des codons K540E, A581G et A613T/S. Toutefois, notre étude a montré que la HRM est plus sensible que la PCR-RFLP dans la détection des infections mixtes. En outre, la HRM est une technique rapide, précise et fiable, donc idéale pour le génotypage des marqueurs moléculaires de la résistance surtout dans les populations hébergeant plus d'infections polyclonales. Ensuite, nous avons déterminé la faisabilité de l'extraction de l'ADN à partir des TDR collectés au Sénégal et aux Comores en déterminant la prévalence des mutations des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*. Ainsi, nous avons trouvé des prévalences élevées de mutation au niveau des codons N51I, C59R et S108N du gène *Pfdhfr* et au niveau du codon A437G du gène *Pfdhps*, similaires à celles trouvées par une étude utilisant de l'ADN extrait à partir de sang fixé sur papier filtre. En outre, de nouvelles mutations (*Pfdhps* 436Y/437A) ont été détectées par HRM et ont été confirmées par séquençage. Comme la quintuple mutation, n'a pas été observé dans ces études, la SP peut continuer à être utilisée pour le TPI chez la femme enceinte. Par conséquent, les TDR peuvent être une source précieuse d'ADN pour des études génétiques et épidémiologiques dans des conditions où les échantillons de papier filtre ou de sang veineux sont inexistantes. Enfin, la dernière étude s'est focalisée sur l'évolution de la prévalence de la délétion en *PfRh2b* au Sénégal et en Gambie. Nous avons trouvé une diminution de la prévalence de la délétion à Thiès et une fluctuation de celle-ci à Brikama. En outre, les valeurs *Fst* trouvées dans cette étude indiquent qu'il existe peu de différence génétique entre les allèles au cours du temps suggérant que *PfRh2b* est sous sélection équilibrée à Thiès et à Brikama. Cependant, ces variations temporelles et spatiales pourraient constituer un obstacle à la validation de cette protéine comme potentiel candidat vaccin, car elles peuvent affecter son efficacité.

Molecular study of *Pfdhfr*, *Pfdhps* polymorphism and evolution of *PfRh2b* deletion in *Plasmodium falciparum*

Summary

Malaria remains a major challenge for global health. To contribute to the fight against this disease, we studied the mutations of the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes associated with the resistance of *Plasmodium falciparum* to SP and the polymorphism of the *PfRh2b* gene involved in the merozoite invasion process in the erythrocyte. Parasitic DNA was extracted from whole blood, blood fixed on filter paper, and RDTs. Genotyping of the *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes was performed by PCR-RFLP and HRM and that of the *PfRh2b* gene by semi-nested PCR. We first compared the results of the HRM and those of the PCR-RFLP in two countries of different endemicity (Senegal and Tanzania). Both techniques showed a high prevalence of mutations in the *Pfdhfr* (codons N51I, C59R and S108N) and *Pfdhps* (codon A437G) genes. No mutations were detected at codons K540E, A581G and A613T/S. However, our study showed that HRM is more sensitive than PCR-RFLP in the detection of mixed infections. In addition, HRM is a fast, accurate and reliable technique, therefore ideal for genotyping molecular markers of resistance especially in populations harboring more polyclonal infections. Then, we determined the feasibility of DNA extraction from RDTs collected in Senegal and Comoros by determining the prevalence of *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes mutations. Thus, we found high prevalence of mutations at codons N51I, C59R and S108N of the *Pfdhfr* gene and at codon A437G of the *Pfdhps* gene, similar to those found in a study using DNA extracted from blood fixed on filter paper. In addition, new mutations (*Pfdhps* 436Y/437A) were detected by HRM and confirmed by sequencing. Since the quintuple mutation was not observed in these studies, SP can continue to be used for IPT in pregnant women. Therefore, RDTs can be a valuable source of DNA for genetic and epidemiological studies under conditions where blood fixed on filter paper or venous blood samples are non-existent. Finally, the last study focused on the evolution of the prevalence of deletion in *PfRh2b* in Senegal and The Gambia. We found a decrease in the prevalence of the deletion in Thiès and a fluctuation of it in Brikama. In addition, the *Fst* values found in this study indicate that there is little genetic difference between alleles over time suggesting that *PfRh2b* is under balanced selection in Thiès and Brikama. However, these temporal and spatial variations could be an obstacle to the validation of this protein as potential vaccine candidate, because they can affect the effectiveness of the vaccine.

Discipline : Parasitologie

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*, Polymorphisme, *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *PfRh2b*, TDR, PCR/RFLP, HRM, Sénégal, Gambie, Tanzanie, Comores.

UCAD/ED-SEV, Faculté des Sciences et Techniques, Avenue Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann, Sénégal