

# Surveillance moléculaire de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine à Bobo-Dioulasso : évaluation de la fréquence des allèles du gène *k13-propeller*

Thomas BAZIE<sup>1</sup>, A. Fabrice SOME<sup>1</sup>, Catherine Ebou NEYA<sup>1</sup>, Frederic NIKIEMA<sup>1</sup>,  
Issaka ZONGO<sup>?</sup>, Jean-Bosco OUEDRAOGO<sup>1</sup>

## Résumé

L'apparition récente de phénotype résistant suscite des inquiétudes sur l'efficacité du traitement du paludisme, menaçant ainsi tous les efforts de contrôle et d'élimination de la maladie. L'analyse des allèles du gène *k13-propeller*, conférant la résistance à l'artémisinine, s'avère donc primordiale dans les pays comme le Burkina Faso utilisant des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Les échantillons biologiques ont été collectés de Juillet à Décembre 2012 chez des participants atteints de paludisme simple et randomisés 1 : 1 pour recevoir l'Artémether-Luméfamtrine (AL) ou l'Artésunate-Amodiaquine (AS-AQ) dans les Centres de Santé de Colsama et Sakaby à Bobo-Dioulasso. Pour chaque participant, des gouttes de sang ont été collectées sur papier filtre aux jours 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 et à tout autre jour où le participant s'est senti malade. Pour les parasites collectés au jour 0, nous avons évalué la prévalence des mutations au niveau du gène *k13-propeller*. Au total 228 participants ont été inclus dans l'analyse moléculaire par PCR nichée et au séquençage. A J28, avant la correction l'efficacité thérapeutique étaient de 97,27 % pour AS-AQ et 86,48 % pour AL. Après ajustement par PCR ces résultats étaient de 98,18 % pour AS-AQ et 89,19 % pour AL. Par ailleurs, nous avons observé 2,26 % de mutations synonymes du gène *k13-propeller* soit 2 mutations C469C, une Y493Y, une G496G et une V589V. Les résultats de cette étude démontrent une absence des mutations K13 associées à la résistance à l'artémisinine et confirme l'efficacité des CTA dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso.

**Mots-clés :** Résistance, *Plasmodium*, CTA, Paludisme, *k13-propeller*, Bobo-Dioulasso.

## Monitoring the resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin: Evaluation of *k13-propeller* gene alleles in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

### Abstract

The recent onset of artemisinin-resistant phenotype has raised new concerns about malaria treatment, threatening all efforts to control and eliminate the disease. Evaluation of alleles of the *k13-propeller* gene remains of paramount importance in monitoring the efficacy of artemisinin-based therapeutic combinations (ATC) in countries like Burkina Faso using of ATC. The biological samples from this study were collected from July to December 2012 in patients randomized 1:1 to receive Artemether-Lumefantrine (AL) or Artesunate-Amodiaquine (AS-AQ) for the treatment of uncomplicated malaria in the urban health centers of Colsama and Sakaby at Bobo-Dioulasso. For all participants, blood drops were collected on filter paper on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 and on any other day the participant felt sick. For parasites collected on day 0 prior to the treatment of participants at inclusion, we assessed the prevalence of mutations at the

<sup>1</sup> Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Direction Régionale, 399, Avenue de la Liberté 01 BP 545 Bobo-Dioulasso 01 Tél. : (226) 20.98.18.80, E-mail : drbobo.irss@fasonet.bf, Burkina Faso

\* Auteur correspondant : E-mail: bazthomas3@yahoo.fr

*k13-propeller* gene. A total of 228 participants were included in the nested PCR molecular analysis and sequencing. At D28, PCR unadjusted therapeutic efficacy was 97.27 % for AS-AQ versus 86.48 % for AL while PCR adjusted therapeutic efficacy was 98.18% for AS-AQ and 89.19 % for AL. We founded baseline prevalence of 2.26 % (5/221) of synonymous mutations in the *k13-propeller* gene precisely C469C, Y493Y, G496G and V589V. The results of this study demonstrated the absence of mutations on *K13-propeller* gene associated with artemisinin resistance in Southeast Asia suggesting therefore that ATCs remain efficacious in the treatment of uncomplicated malaria in Bobo-Dioulasso.

**Keywords:** Resistance, *Plasmodium falciparum*, ACTs, Malaria, *k13-propeller*.

## Introduction

Au Burkina Faso, le paludisme demeure un problème de santé publique. Il constitue la première cause de consultation et d'hospitalisation dans les formations sanitaires. Ainsi, d'après le rapport 2018 du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), le pays a enregistré en 2017 environ 11 915 816 cas de paludisme simple avec une incidence dans la population générale de 607 cas pour 1 000 habitants (1). Malgré les nombreux efforts consentis, le contrôle du paludisme reste compromis par la résistance non seulement du vecteur aux insecticides mais aussi et surtout du parasite aux antipaludiques disponibles. En réponse à l'émergence et à la propagation de la résistance à la Chloroquine (CQ) et à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP), le Burkina Faso à l'instar de la plupart des pays endémiques, a adopté depuis 2005, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le traitement du paludisme simple (2). De nombreuses études ont ainsi démontré l'efficacité thérapeutique des CTA dans le traitement du paludisme simple dans le pays (3-6). Cependant, l'apparition de phénotype résistant à l'artémisinine dans les frontières Thaï-Cambodgiennes (7, 8) suscite de nos jours des inquiétudes pour le traitement du paludisme, menaçant ainsi tous les efforts de contrôle et d'élimination de la maladie. Très récemment, les travaux d'Ariey ont permis d'identifier un locus génétique sur le chromosome 13 « *K13-propeller* » associé à la résistance *in vitro* et *in vivo* de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine (9). Ainsi dans le cadre de contrôle et de surveillance de routine d'efficacité des antipaludiques, l'objectif principal de cette étude est de surveiller l'efficacité thérapeutique des CTA disponibles dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso. Il s'agit d'évaluer la prévalence des mutations *K13-propeller* d'une part, et comparer les efficacités thérapeutiques d'AL et AS-AQ dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso d'autre part.

## I. Méthode

### 1.1. Site d'étude

Il s'agit d'une surveillance de l'efficacité thérapeutique des CTA conduite de juillet à décembre 2012 dans les Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Colsama et Sakaby dans le district sanitaire de Do en zone urbaine de Bobo-Dioulasso. Les participants à cette étude ont été recrutés dans les populations vivant dans les aires sanitaires de ces 2 centres de santé.

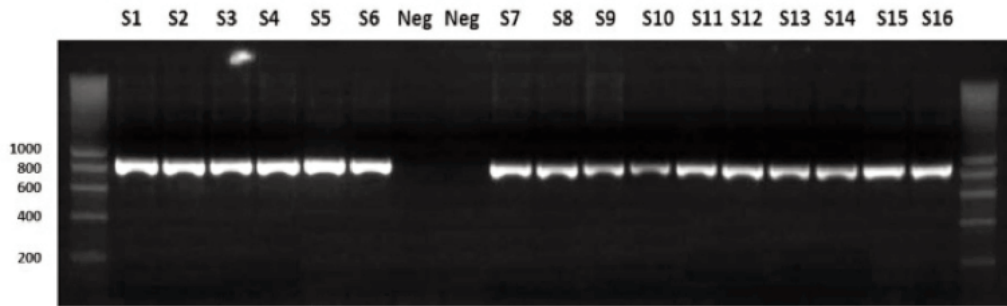
### 1.2. Patients et critères d'inclusion

Les participants à l'étude sont ceux diagnostiqués positifs à la goutte épaisse avec une parasitémie comprise entre 2 000 et 200 000 parasites par microlitre de sang, un taux d'hémoglobines supérieures à 5 g/dl et répondant aux autres critères suivants : être âgé de plus de 6 mois et avoir un poids corporel > 5 kg ; avoir une température axillaire de 37,5 °C ou une histoire fébrile dans les 24 heures

précédant l'examen. Les critères d'exclusion étaient la présence de signes de danger ou de paludisme grave, présence d'un traitement antipaludique en cours durant les deux dernières semaines. Le protocole de l'étude clinique a été approuvé par le comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ.

### 1.3. Collectes des échantillons et analyses moléculaires au laboratoire

Les participants inclus étaient randomisés en deux bras soit un premier groupe de 111 recevant AL, et un deuxième groupe de 110 ayant reçu AS-AQ. Pour chaque participant des prélèvements sanguins ont été effectués au bout du doigt pour la confection de goutte épaisse (GE) et d'un frottis minces au jour 0 à l'inclusion et aux jours 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 et aux jours imprévus où le patients revenait parce qu'il se sentait malade. Quelques gouttes de sang ont également été recueillies aux mêmes périodes sur du papier filtre pour les analyses génétiques de *P. falciparum*. Les confettis des jours 0 et jours d'échecs ont servi à l'analyse des marqueurs de résistances de *P. falciparum* ainsi qu'au génotypage pour la distinction entre nouvelles infections et recrudescences et pour évaluer le polymorphisme du gène *K13-propeller* nous avons utilisés les confettis des jours 0. Les densités parasitaires (DP), exprimées en nombre de parasites par microlitre ( $\mu\text{L}$ ) de sang ont été calculées sur la base des leucocytes à partir de la lecture de la goutte épaisse après coloration de l'étalement au Giemsa 10 % pendant 10 minutes. Pour le génotypage, l'ADN du parasite a été extrait des confettis collectés en suivant le protocole de purification d'ADN du kit QIAGEN « Qiagen, QiamplDNA Mini-blood ». Nous avons utilisé la technique de la PCR (en anglais « Polymerase chain reaction ») nichée pour amplifier les séquences d'ADN de *P. falciparum* des gènes *msp1* (Merozoite Surface Protein 1), *msp2* (Merozoite Surface Protein 2) afin de distinguer les nouvelles infections des recrudescences. Nous avons également amplifié par la même technique le domaine Propeller du gène *K13* (codons :440-680,720pb) pour évaluer la prévalence des polymorphismes associés à la résistance à l'artémisinine(9). Pour le contrôle de qualité, nous avons extrait et analyser en même temps six souches de *P. falciparum* avec des allèles connus du *k13*. Les produits de la PCR nichée ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % et les bandes d'ADN faite révélées aux rayons ultra-violets. Pour distinguer les nouvelles infections des recrudescences chez chaque participant ayant un échec thérapeutique, nous avons comparé le nombre et la position des bandes de fragments d'ADN du jour d'inclusion (J0) et du jour d'échec thérapeutique. Les résultats ont été exprimés en termes de recrudescence, nouvelle infection ou indéterminé. Le résultat est considéré comme valide lorsqu'il existait au moins une bande d'ADN de l'allèle étudié. Deux allèles ont été considérés identiques lorsqu'ils différaient de seulement 10 paires de base pour *msp1*, *msp2* ; dans de telle situation l'infection est dite recrudescence, sinon elle est classée nouvelle infection (10). Les résultats de l'amplification du gène *k13* ont été validés lorsque les tailles des bandes d'ADN sont identiques à celles des contrôles positifs soit 849 paires de bases (figure 1). Pour le génotypage des allèles de *K13-propeller*, des aliquots de 20-40 $\mu\text{L}$  du produit de PCR nichée ont été expédiés pour le séquençage à Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton aux Royaumes Unis. Les produits de PCR ont été séquencés par MacroGen et les résultats analysés sur les deux brins d'ADN avec PF3D7\_1343700 comme séquence de référence. Les résultats ont été classés en termes d'infection de type sauvage, mutant ou mixte. Le génotype du parasite a été considéré sauvage lors qu'il présentait uniquement la même séquence d'acides aminés que celle du parasite de contrôle sauvage. Il a été considéré mutant lorsqu'il présentait uniquement la même séquence d'acides aminés que celle du parasite de contrôle mutant et mixte lorsqu'il présente les bandes du sauvage et du mutant.



**Figure 1** : Photo du gel d'agarose montrant les bandes d'ADN après électrophorèse

Source : SOP Projet KARMA (mars 2014) S=souche, et Neg = Contrôle négatif

#### 1.4. Analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur Microsoft office Excel 2007 et analysées avec le logiciel STATA version 12. Le test de Chi2 a été utilisé pour comparer les variables catégorielles et mesurer leur association avec un niveau de signification de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## II. Résultats

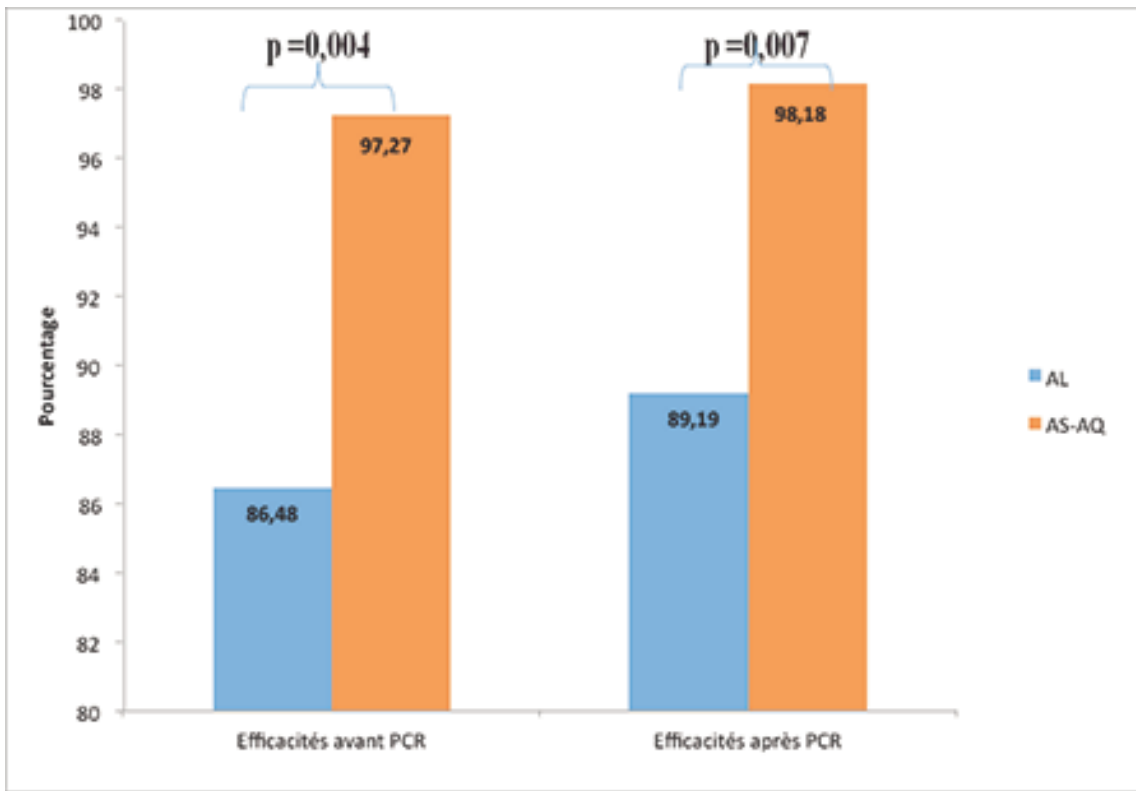
Sur un total de 244 participants inclus dans l'étude, 228 (93,44 %) ont complété le suivi de 28 Jours et 16 participants ont été exclus au cours de l'étude. Deux cent vingt-et-un échantillons (90,57 %) ont été séquencés avec succès dont 111 dans le bras de traitement à AL et 110 dans celui de AS-AQ, 7 échantillons n'ont pas pu être séquencés.

### 2.1. Efficacités thérapeutiques de AL et AS-AQ avant et après PCR

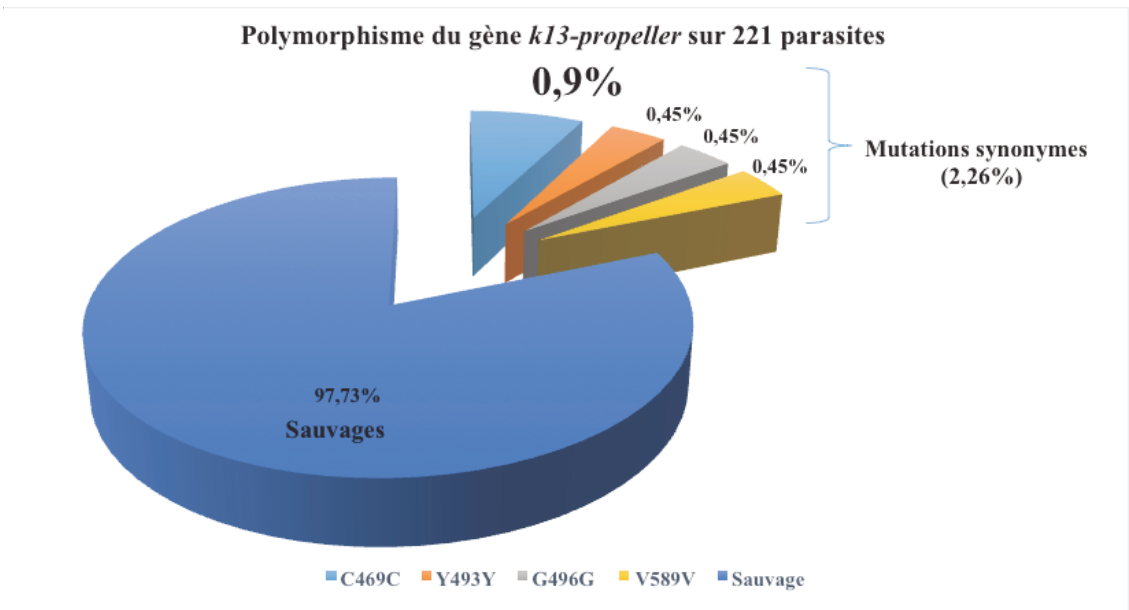
La figure 2 ci-dessous montre qu'avant et après la correction par PCR, l'efficacité thérapeutique de AS-AQ était significativement supérieure à celle de AL ( $p= 0,007$ , figure 2).

### 2.2. Polymorphisme du gène *k13-propeller*

Après séquençage du gène *k13-propeller* Pf3D7\_1343700, nous avons identifié 5 (2,26 %) mutations synonymes du gène *k13-propeller* (deux C469C, une Y493Y, une G496G, et une V589V) (figure 3).



**Figure 2** : Efficacité thérapeutique de AS-AQ et AL.



**Figure 3** : Polymorphisme du gène *k13-propeller*.

## III. Discussion

### 3.1. Polymorphisme du gène *k13-propeller*

Après analyse du gène *k13-propeller*, nous n'avons détecté aucun polymorphisme associé à la résistance à l'artémisinine existant en Asie du Sud-Est tels que les mutations de types C580Y, I543T, Y493H, R539T. Dans notre étude, on a reporté une faible prévalence de mutations synonymes du gène *k13-propeller* et aucun cas de mutation non synonyme. Ce résultat corrobore avec ceux d'études récentes n'ayant également pas observé de mutations associées à la résistance à l'artémisinine, en Afrique sub-saharienne (11-13) dans l'île des Comores (14), et au Bangladesh (15). L'absence de mutations de gène *k13-propeller* associées à la résistance à l'artémisinine suggère que les CTA et autres dérivées de l'artémisinine restent efficaces dans la prise en charge du paludisme au Burkina Faso. Cependant, une étude récente a rapporté l'identification d'une mutation *K13* unique en Ethiopie (16). Cette mutation *R622I* située sur la lame 5 du domaine Propeller n'avait jamais été observée précédemment en Afrique. La mise en place à large échelle d'une surveillance de l'évolution de ce marqueur de résistance à l'artémisinine dans les régions endémiques du paludisme en Afrique demeure une nécessité afin d'anticiper les mesures palliatives en proposant les traitements adaptés à la situation épidémiologique.

### 3.2. Efficacité thérapeutique de AS-AQ et AL dans le traitement du paludisme

Au jour 28, l'efficacité après correction par PCR de AS-AQ (98,18 %) était significativement supérieure à celle de AL (89,19 %). Des études antérieures dans la même zone en 2007, juste après l'adoption de ces CTA au Burkina Faso ont rapporté une efficacité de AL et AS-AQ supérieure à 90 % (5, 6) suggérant de ce fait une baisse de l'efficacité de AL. D'autres études d'efficacité de AS-AQ et AL dans différentes régions du Burkina Faso ont également rapporté une efficacité de ces deux CTA supérieure à 90 % dans les cas de traitements directement supervisés (3, 17, 18) ou inférieure à 90 % dans les cas de traitements non supervisés (4, 19). La différence d'efficacité entre les deux CTA pourrait s'expliquer par la différence de la durée de demi-vie des médicaments partenaires. En effet, l'amodiaquine a une demi-vie plus longue que celle de la luméfántrine résultant ainsi en une protection plus prolongée des sujets. La faible efficacité de AL dans cette étude peut également s'expliquer par la non utilisation d'aliment gras pour faciliter l'absorption de la luméfántrine chez les patients ayant reçu AL. En effet, la biodisponibilité des médicaments varie en fonction des individus et dépend de plusieurs facteurs dont entre autres la tolérance au traitement et les habitudes alimentaires (20, 21). Des études ont ainsi démontré que l'administration de AL en présence d'aliment gras permettrait de maximiser l'absorption de la Luméfántrine et atteindre un niveau thérapeutique adéquat dans le plasma (21). Par ailleurs, malgré la différence observée dans cette étude, les deux CTA étaient bien tolérés avec des effets secondaires mineurs dans le traitement du paludisme simple à Bobo-Dioulasso.

## Conclusion

Aux termes de cette étude de surveillance d'efficacité thérapeutique de AL et AS-AQ, nous avons noté une excellente efficacité pour AS-AQ, et une efficacité acceptable pour AL dans la prise en charge du paludisme simple à Bobo-Dioulasso. Ainsi, les mutations synonymes du gène *k13-propeller* observées dans cette étude n'étant pas associées à la résistance conforte l'utilisation

des CTA telle que recommandée au Burkina Faso. Outre le respect et le renforcement des mesures préventives, il s'avère donc nécessaire de conduire à large échelle des études de surveillance de l'efficacité afin de déceler toute éventuelle présence des mutations associées à la résistance à l'artémisinine dans notre pays.

## Références bibliographiques

1. PNL. **Annuaire statistique 2017. 2018.**

2. GANSANE A., NEBIE I., SOULAMA I., TIONO A., DIARRA A., KONATE A. T., *et al.* [Change of antimalarial first-line treatment in Burkina Faso in 2005]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2009;102(1):31-5.

3. SIRIMA S. B., TIONO A. B., GANSANE A., DIARRA A., OUEDRAOGO A., KONATE A. T., *et al.* The efficacy and safety of a new fixed-dose combination of amodiaquine and artesunate in young African children with acute uncomplicated *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal.* 2009;8:48.

4. TINTO H., DIALLO S., ZONGO I., GUIRAUD I., VALEA I., KAZIENGA A., *et al.* Effectiveness of artesunate-amodiaquine vs. artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Nanoro, Burkina Faso: a non-inferiority randomised trial. *Trop Med Int Health.* 2014;19(4):469-75.

5. ZONGO I., DORSEY G., ROUAMBA N., DOKOMAJILAR C., SERE Y., ROSENTHAL P. J., *et al.* Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso. *Clin Infect Dis.* 2007;45(11):1453-61.

6. ZONGO I., DORSEY G., ROUAMBA N., TINTO H., DOKOMAJILAR C., GUIGUEMDE R. T., *et al.* Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2007;369(9560):491-8.

7. DENIS M. B., TSUYUOKA R., PORAVUTH Y., NARANN T. S., SEILA S., LIM C., *et al.* Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health.* 2006;11(9):1360-6.

8. DONDORP A. M., NOSTEN F., YI P., DAS D., PHYO A. P., TARNING J., *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009;361(5):455-67.

9. ARIEY F., WITKOWSKI B., AMARATUNGA C., BEGHAIN J., LANGLOIS A. C., KHIM N., *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014;505(7481):50-5.

10. CATTAMANCHI A., KYABAYINZE D., HUBBARD A., ROSENTHAL P. J., DORSEY G. Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2003;68(2):133-9.

11. HAWKES M., CONROY A. L., OPOKA R. O., NAMASOPO S., ZHONG K., LILES W. C., *et al.* Slow Clearance of *Plasmodium falciparum* in Severe Pediatric Malaria, Uganda, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(7):1237-9.

12. KAMAU E., CAMPINO S., AMENGA-ETEGO L., DRURY E., ISHENGOMA D., JOHNSON K., *et al.* K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 2015;211(8):1352-5.

13. TAYLOR S. M., PAROBK C. M., DECONTI D. K., KAYENTAO K., COULIBALY S. O., GREENWOOD B. M., *et al.* Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis.* 2015;211(5):680-8.

14. HUANG B., DENG C., YANG T., XUE L., WANG Q., HUANG S., *et al.* Polymorphisms of the artemisinin resistant marker (K13) in *Plasmodium falciparum* parasite populations of Grande Comore Island 10 years after artemisinin combination therapy. *Parasit Vectors.* 2015;8:634.

15. MOHON A. N., ALAM M. S., BAYIH A. G., FOLEFOC A., SHAHINAS D., HAQUE R., *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009-2013). *Malaria journal.* 2014;13:431.

16. BAYIH A. G., GETNET G., ALEMU A., GETIE S., MOHON A. N., PILLAI D. R. A Unique *Plasmodium falciparum* K13 Gene Mutation in Northwest Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2016;94(1):132-5.

17. 4ABC Study Group, ATWINE D. B., BASSAT Q. CV, D'ALESSANDRO U., DHORDA M., DONEGAN S., *et al.* A head-to-head comparison of four artemisinin-based combinations for treating uncomplicated malaria in African children: a randomized trial. *PLoS Medicine* 2011;8.

- 18. SIRIBIE M., DIARRA A., TIONO A. B., SOULAMA I., SIRIMA S. B.** [Effect of a large scale community-based distribution of artemether-lumefantrine on its therapeutic efficacy among children living in a rural area of Burkina Faso]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2015;108(2):120-3.
- 19. SONDO P., DERRA K., DIALLO-NAKANABO S., TARNAGDA Z., ZAMPA O., KAZIENGA A., et al.** Effectiveness and safety of artemether-lumefantrine versus artesunate-amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in patients of all age groups in Nanoro, Burkina Faso: a randomized open label trial. *Malaria journal.* 2015;14:325.
- 20. SCHMIDT L. E., DALHOFF K.** Food-drug interactions. *Drugs* 2002;62(10):1481-502.
- 21. WHITE N. J., VAN VUGT. M., EZZET F.** Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin Pharmacokinet.* 1999;37(2):105-25.