

# Réduction de la prévalence de la mutation 76T du gène *Pfcr* de *Plasmodium falciparum* une décennie après l'introduction des thérapies combinées à base d'artémisinine dans un contexte de mise en œuvre de la chimioprévention du paludisme saisonnier au Burkina Faso

Séni NIKIEMA<sup>1,3</sup>, Issiaka SOULAMA<sup>2,3</sup>,  
Salam SAWADOGO<sup>1,3</sup>, Salif SOMBIE<sup>3</sup>,  
Samuel Sindie SERME<sup>4</sup>, Noëlie BERE/HENRY<sup>4</sup>,  
Nicolas OUEDRAOGO<sup>3</sup>, Emelie BADOUM<sup>4</sup>,  
Nathalie OUARE<sup>5</sup>, Haffsatou SAWADOGO<sup>3,6</sup>,  
Raissa P. ILY<sup>2,5</sup>, Guillene N.Y. TIBIRI<sup>2,6</sup>,  
Djamila OA ZOURE<sup>3,5</sup>, Nassandba J YANOOGO<sup>1,3</sup>,  
Farida CA KABORE<sup>1,3</sup>, Chanolle TCHEKOUNOU<sup>3,7</sup>,  
Oumarou OUEDRAOGO<sup>2</sup>, Dramane ZONGO<sup>2</sup>,  
Adam ZIDA<sup>3,5,6</sup>, Abdou Azaque ZOURE<sup>2</sup>,  
Florence Wendkuuni DJIGMA<sup>1</sup>, Jacques SIMPORE<sup>1,8</sup>

## Résumé

En 2005, le Burkina Faso introduisait les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) comme médicament de première intention dans le traitement du paludisme non compliqué à la suite des cas de résistance observés avec la chloroquine. Quelques années plus tard, en 2012 l'OMS recommandait le recours à la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) comme stratégie efficace pour réduire le fardeau du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans. La présente étude vise à évaluer le niveau de prévalence de la mutation *pfcr76T* associé à la résistance du parasite aux quinolones, une décennie environ après introduction des CTAs et quelques années après la mise en œuvre de la CPS au Burkina Faso.

Au total, 403 patients volontaires ont été recrutés dans cette étude : 181 patients dans les districts sanitaires de Banfora et Saponé en 2013 une décennie environ

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génétique (LABIOGENE), Université Joseph KI-ZERBO, 0022663709155, Ouagadougou, Burkina Faso, [seninikiema@yahoo.fr](mailto:seninikiema@yahoo.fr)

<sup>2</sup> Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Centre National, 0022670757190, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso, [soulamacnrfp@gmail.com](mailto:soulamacnrfp@gmail.com)

<sup>3</sup> Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP)/Institut National de Santé Publique (INSP), 0022663085714, Ouagadougou, Burkina Faso; [salifsombie@yahoo.fr](mailto:salifsombie@yahoo.fr)

<sup>4</sup> Groupe de Recherche Action en Santé, 0022670335255, Ouagadougou, Burkina Faso; [sermesame@yahoo.fr](mailto:sermesame@yahoo.fr)

<sup>5</sup> Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS) de l'Université Joseph KI-ZERBO (UJKZ), 0022672887228, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso. [ephiaouare@gmail.com](mailto:ephiaouare@gmail.com)

<sup>6</sup> Laboratoire de Biochimie et Immunologie Appliquées (LABIA), Université Joseph KI-ZERBO, 0022670286186, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso, [haffsasawa@yahoo.fr](mailto:haffsasawa@yahoo.fr)

<sup>7</sup> Institut International des Sciences et Technologie (IISTech), 60434429, Ouagadougou, [chanoltechek@gmail.com](mailto:chanoltechek@gmail.com)

<sup>8</sup> Centre de Recherche Biomoléculaire Pietro Annigoni (CERBA), 0022670230792, Ouagadougou, Burkina Faso ; [simpore93@gmail.com](mailto:simpore93@gmail.com)

\*Auteur correspondant : Seni NIKIEMA, 0022663709155, [seninikiema@yahoo.fr](mailto:seninikiema@yahoo.fr)

l'introduction des CTAs avant la mise en œuvre de la CPSet 222 enfants suivis au cours de la CPS en 2020 au moment où elle est mise en œuvre à l'échelle du pays. Des échantillons de sang ont été collectés pour la confection de frottis sanguins pour l'identification microscopique des parasites et pour la confection de spots sanguins afin de détecter les mutations *Pfcr76T* par PCR/RFLP.

La prévalence *Pfcr76T* était d'environ 34 % dans notre étude en 2013. Cependant, cette prévalence de *Pfcr76T* a été significativement réduite à 3,38 % en 2020.

L'étude a montré une fois de plus qu'une diminution de la prévalence *Pfcr76T* associée à la résistance du parasite aux quinolones a été observée de 2013 à 2020.

**Mots clés :** Paludisme, *Plasmodium falciparum*, *Pfcr76T*, marqueurs de résistances, Burkina Faso

## **Reduction in *Pfcr76T* prevalence decade after introduction of the artemisinin-based combinations therapies in a context of seasonal malaria chemoprevention implementation in Burkina Faso**

### **Abstract**

In 2005, Burkina Faso introduced artemisinin-based combination therapies (ACTs) as a first-line treatment for uncomplicated malaria, following cases of resistance observed with chloroquine. A few years later, in 2012, the WHO recommended the use of seasonal malaria chemoprevention (SMC) as an effective strategy for reducing the burden of malaria in children under five. The aim of the present study was to assess the prevalence of the *Pfcr76T* mutation associated with parasite resistance to quinolones, around a decade after the introduction of ACTs and a few years after the implementation of SMC in Burkina Faso.

A total of 403 volunteer patients were recruited in this study: 181 patients in the Banfora and Saponé health districts in 2013, around a decade after the introduction of ACTs, before the implementation SMC, and 222 children followed up during SMC in 2020, when it was implemented nationwide. Blood samples were collected for the preparation of blood smears for microscopic identification of parasites and for the preparation of blood spots to detect *Pfcr76T* mutations by PCR/RFLP.

The prevalence *Pfcr76T* was around 34% in our study in 2013. However, this *Pfcr76T* prevalence was significantly reduced to 3.38% in 2020.

The study showed once again that a decrease in *Pfcr76T* prevalence associated with parasite resistance to quinolones was observed from 2013 to 2020.

**Key words:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, *Pfcr76T*, resistance markers, Burkina Faso

## **Introduction**

Le paludisme, à l'échelle mondiale, reste une priorité en matière de santé, car il constitue l'une des principales causes de morbidité et de mortalité, en particulier dans les zones endémiques (1). Il s'agit d'une infection parasitaire transmise à l'homme par la piqûre de l'anophèle

femelle infectée. Environ 200 espèces de *Plasmodium* infectent les mammifères, les rongeurs, les oiseaux et les amphibiens, et au moins cinq espèces de *Plasmodium* provoquent le paludisme chez l'homme. Parmi ces espèces, *P. falciparum* est la plus courante, la plus dangereuse et responsable de complications souvent mortelles(2). De nombreuses stratégies sont mises en œuvre pour contrôler cette maladie. Parmi ces stratégies, on note l'utilisation généralisée de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, le traitement préventif intermittent à la Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) chez les femmes enceintes, la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants âgés de 3 à 59 mois avec l'utilisation de SP+AQ (Amodiaquine en association avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine) et le traitement curatif par les CTAs (Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine). L'une des difficultés majeures du traitement (curatif ou prophylactique) du paludisme réside actuellement dans l'apparition et la progression de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques en général. *P. falciparum* est actuellement résistant aux médicaments antipaludiques les plus récents et les plus efficaces, les CTAs(3). En effet, l'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine au Cambodge(4) constitue une menace sérieuse pour la prise en charge des cas de paludisme simple. Cette résistance se caractérise par une diminution de la sensibilité des CTAs observée en Asie du Sud-Est et serait responsable d'échecs thérapeutiques. Face aux dégâts causés par la résistance, il est donc nécessaire de mener des études qui permettront sans aucun doute d'évaluer et de suivre la résistance du parasite aux médicaments antipaludiques actuels. La prévalence élevée des mutations pourrait compromettre l'efficacité des médicaments antipaludiques utilisés. Ainsi, plusieurs études menées à travers le monde en général et particulièrement au Burkina Faso ont identifié plusieurs mutations associées à la résistance aux antipaludiques, notamment la mutation génétique *Pfcr76T* du parasite, associée à la résistance aux quinolones (chloroquine/amodiaquine)(5–7). La forte prévalence de la mutation *Pfcr76T* associée à l'échec de la chloroquine et l'amodiaquine a conduit plusieurs pays à modifier leur politique de traitement, par exemple avec des thérapies combinées à base d'artémisinine(8).

Le contexte d'utilisation répétée et généralisée de la SP+AQ lors de la CPS augmenterait la pression médicamenteuse et conduirait à la sélection de souches résistantes. La prévalence accrue des cas de

paludisme nécessite d'évaluer la prévalence des mutations *Pfcr76T* associées à la résistance à l'AQ plusieurs années après l'introduction des CTAs et dans le contexte de la mise en œuvre de la CPS.

La présente étude vise à évaluer la prévalence de la mutation *Pfcr76T* dans un contexte de mise en œuvre de la chimioprévention du paludisme saisonnier qui survient environ une décennie après l'introduction en 2005 des thérapies combinées à base d'artémisinine au Burkina Faso.

## **I. Méthodes**

### **I.1. Site d'étude, population et prélèvement d'échantillons**

Pour permettre une meilleure appréciation du contexte de prévalence de *Pfcr76T* après introduction des CTAs et surtout avant la mise en œuvre de la CPS, stratégie à fort potentiel d'impact, nous avons utilisé des échantillons collectés en septembre 2012 et en septembre 2013 dans les districts sanitaires de Banfora et Saponé, situés respectivement dans les régions des cascades (à l'ouest du Burkina Faso) et du centre-sud du Burkina Faso. Cette période d'étude a inclus 181 participants âgés de 6 mois et plus. La CPS a été mise en œuvre au Burkina Faso en 2014. Les échantillons utilisés lors de la mise en œuvre de cette stratégie ont été collectés de juillet à octobre 2020 (six ans après la mise en œuvre de la CPS) et ont concerné 222 enfants, sans distinction de sexe, âgés de 3 à 59 mois recevant de la SP+AQ dans le cadre du CPS en 2020. Pour chaque participant inclus, nous avons utilisé des échantillons de sang prélevés sur papier filtre par piqûre au doigt. Les échantillons de sang sur papier filtre séchés ont été conservés chacun dans un sac plastique contenant du silicagel pour garder le milieu sec, puis insérés dans une enveloppe et stockés au laboratoire de biologie moléculaire du Centre National de Recherche et de Formation sur Paludisme, CNRFP, pour les analyses moléculaires.

### **I.2. Extraction de l'ADN du parasite et caractérisation de la mutation *Pfcr76T* par PCR-RFLP**

L'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* a été extrait à partir des papiers filtres à l'aide du kit QIAamp® DNA Blood Mini (conformément aux instructions du fabricant). La caractérisation de la mutation *Pfcr76T* a été réalisée par PCR-RFLP (PCR nichée suivie d'une restriction enzymatique) composée de deux étapes principales, deux amplifications consécutives de séquences d'ADN spécifiques par

PCR, suivies d'une digestion enzymatique par une enzyme de restriction (*ApoI*). Cette caractérisation de mutations du gène *Pfcr1* a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques et d'enzymes de restriction spécifiques indiqués dans le Tableau ci-dessous, selon la procédure décrite dans les protocoles de l'université du Maryland décrits précédemment (9) avec des modifications mineures. Brièvement, les deux amplifications consécutives ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL constitué de 4 µL de 5X FIREPol® Master Mix contenant (tampon, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, Taq polymérase), 1 µL d'amorce sens (1 µM) et 1 µL d'amorce antisens (1 µM), 13,5 µL d'eau stérile et 0,5 µL d'ADN parasitaire. Les amplicons de la deuxième PCR sont soumis à une digestion enzymatique avec l'enzyme *ApoI* à une température de 50°C pendant 6 heures. Environ dix microlitres de chaque produit PCR issus de la deuxième amplification ont ensuite été analysés et séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % coloré contenant du Redsafe. La coupure par l'enzyme de restriction *ApoI* donne deux fragments de 34 paires de bases (Pb) et 100 Pb pour les types sauvages. L'absence de coupure caractérise la présence de la mutation recherchée avec un fragment unique à 134 Pb. Lestailles des différents fragments du gène *pfcr1* (type sauvage et mutant) ont été caractérisées en se référant au marqueur moléculaire et confirmé par les contrôles.

**Tableau I :** Amorces et programmes pour amplification du gène *pfcr1*

Gènes	Étapes de la PCR	Amorces et séquences	Programmes d'amplification
	PCR1	P1 CCGTTAATAATAAATACACGCAG	94°C x 3min
		P2 CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC	40 x (94°C x30s, 47°Cx1min, 72°C x1, 5min), 72°C x 3 min, maintien à 4°C
<i>Pfcr1</i> 76T	PCR2	D1 TGTGCTCATGTGTTTAAACTT	94°C x 5 minutes
		D2 CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG	30 x (94°C x30s, 52°C x1 min, 72°C x 1 min), 72°C x 3 min, maintien à 4°C

*P. falciparum* Dd2 (MRA-150) et *P. falciparum* 3D7 (MRA-102) reçus de BeiRessources sont utilisés comme contrôle positif, respectivement résistants et sensibles à la chloroquine.

### I.3. Analyses statistiques

Les données ont été saisies à l'aide d'Excel 2016 et analysées à l'aide de STATA version 13. Excel 2010 a également été utilisé pour les

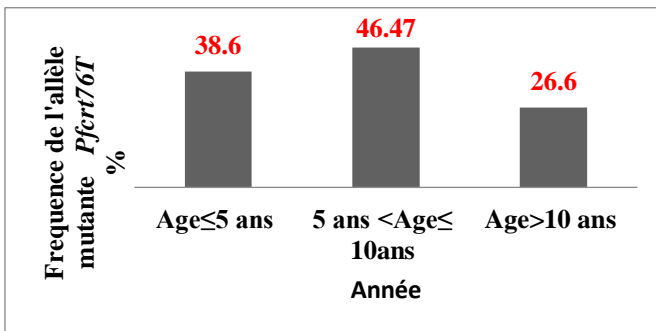
représentations graphiques. Le test du chi carré a été utilisé pour comparer les proportions. La différence était statistiquement significative pour  $p < 0,05$ .

## II.1. Caractéristiques sociodémographiques de la population étudiée

Les échantillons de l'étude collectés en 2013 avant la mise en œuvre de la CPS provenaient de cent quatre-vingt-une (181) personnes vivant à Saponé (120) et Banfora (61). Environ 50,83 % (92/181) des participants étaient de sexe féminin et 49,17 % (89/181) de sexe masculin, ce qui donne une sex-ratio de 1,033 (F/H). L'âge des participants variait de 0 à 59 ans avec une moyenne de  $17,57 \pm 16,2$  ans. Les participants âgés de moins de 5 ans représentaient environ 31,50% de la population. En outre, en 2020 des échantillons ont été collectés auprès de 222 enfants âgés de 3 à 59 mois sous CPS dans la zone sanitaire de Saponé, et les participants étaient constitués de 13,96% (31/222) de sexe féminin et 86,04% (191/222) de sexe masculin donnant un sex-ratio de 1,17 en faveur du genre masculin.

## II.2. Prévalence des souches mutantes (*Pfcr76T*) et sauvages (*Pfcr76K*)

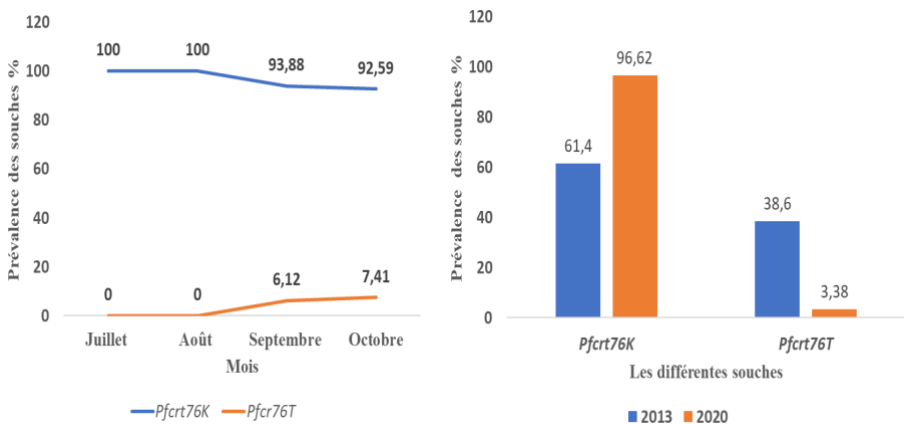
Nous avons déterminé la prévalence de l'allèle mutant (*Pfcr76T*) en fonction de l'âge pour la première étude réalisée en 2013, comme le montre la **figure 1**. Aucune différence statistique n'a été trouvée pour la fréquence de l'allèle mutant *Pfcr76T* en fonction des différents groupes d'âge ( $p = 0,082$ ) mais la proportion de l'allèle mutant est plus faible dans la tranche d'âge >10 ans.



**Figure 1:** Prévalence de *Pfcr76T* selon l'âge en 2013 avant la mise en place de la CPS

L'évaluation de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* dans les échantillons collectés en 2020 lors de la mise en œuvre de la CPS a montré une prévalence globale de 3,38 % statistiquement très faible par rapport à la prévalence constatée en 2013. En outre, la fréquence *Pfcr76T* était nulle pendant les deux premiers cycles de la CPS. Cependant, la prévalence des mutations *Pfcr76T* était respectivement de 6, 12 % et 7, 27 % au cours des cycles 3 et 4 comme l'indique la **figure 2.A**.

De plus, nous avons comparé la prévalence du *Pfcr76T* chez les enfants de moins de 5 ans avant la mise en œuvre du CPS avec celle de notre deuxième étude de 2020 (six ans après la mise en œuvre de la CPS). Nous avons noté une différence statistiquement significative ( $P < 0,05$ ) en comparant la prévalence de la mutation *Pfcr76T* en 2013 et 2020 (avant et après la CPS) avec une prévalence plus élevée avant la CPS qu'après la mise en œuvre selon la **figure 2B**.



**Figure 2. A :** Prévalence des souches mutantes (*Pfcr76T*) et sauvages (*Pfcr76K*) au cours de la CPS en 2020, **B:** Prévalence des différentes souches entre 2013 et 2020.

La mutation *Pfcr76T* est responsable de la résistance du parasite à la chloroquine et la prévalence de cette mutation a augmenté au fil des années, rendant inefficace le traitement du paludisme simple par la chloroquine. Afin de résoudre ce problème de résistance, les CTAs ont été introduites en 2005 dans les directives de traitement du paludisme au Burkina Faso (10). Depuis l'introduction des CTAs, une diminution de la prévalence de *Pfcr76T* a été observée (11–14) montrant ainsi la réduction de la mutation *Pfcr76T* et laissant entrevoir de grands espoirs

d'élimination du paludisme. Il est intéressant de noter que *Pfcr76T* est devenu un marqueur commun pour évaluer indirectement l'efficacité basée sur la résistance à la chloroquine et des CTAs, car les génotypes *Pfcr76T* sont sensibles à la plupart des thérapies combinées à base d'artémisinine. Plusieurs études ont déterminé la prévalence de la mutation *Pfcr76T* comme marqueur d'évaluation de l'efficacité des CTAs au Burkina Faso en particulier et en Afrique en général (10,14,15). On pense que la mutation *Pfcr76T* pourrait contribuer aux échecs thérapeutiques avec les CTAs contenant de l'amodiaquine. La prévalence globale de la mutation *Pfcr76T* associée à la résistance des parasites aux quinolones (chloroquine/amodiaquine) dans les échantillons de patients analysés en 2013 dans le cadre de quelques années d'utilisation des CTAs (8 ans après l'introduction) étaient de 34 % (16) et 38,6 % spécifiquement chez les enfants de moins de cinq ans. Même lorsqu'il s'agissait d'échantillons rétrospectifs analysés, les résultats sont inférieurs à ceux d'études similaires menées au Burkina Faso (quelques années avant l'introduction des CTAs) qui étaient de 61,4 % en 2020(17); 51% en 1998 et 65% en 2001(17) sur des échantillons prélevés à Bobo Dioulasso. Notre étude a montré une diminution de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* et indique donc que les CTAs seraient des traitements appropriés contre les parasites résistants à la chloroquine. Des études menées dans ce sens en 2008 et 2016 montrent également cette diminution de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* après l'introduction des CTAs au Burkina Faso. En effet, les études de Mahamat Hassan Abdel-Aziz et al., en 2008, et Somé et al., en 2016 ont montré une prévalence de 50 et 34 % respectivement(13,18). Cette étude nous a permis d'évaluer la dynamique de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* associée à la résistance du parasite dans la zone où les CTAs sont pleinement introduites. Cependant les marqueurs moléculaires *Pfcr76T* ne sont pas les mieux adaptés pour surveiller la résistance aux CTAs, le marqueur *Kelch13*-propeller qui a montré une association in vivo et in vitro avec la résistance à l'Artémisinine et à ses dérivés devrait être régulièrement surveillé(19). En 2014, ce marqueur moléculaire *K13* associé à la résistance à l'artémisinine a été publiée et adoptée par l'ensemble de la communauté scientifique(20). Bien que plusieurs études de recherche aient été menées en Afrique pour évaluer la prévalence de la mutation du gène *K13* associée à la résistance à l'artémisinine, malheureusement, la plupart des laboratoires ne disposeraient pas d'équipements nécessaires pour séquencer ce marqueur en routine (14). Dans le cadre de la caractérisation de la mutation du gène *K13* en Afrique, 3 257

isolats ont été collectés entre 2011 et 2019 dans onze pays africains endémiques du paludisme, à savoir la Gambie, la Sierra Leone et le Burkina Faso en Afrique de l'Ouest ; Tchad, République centrafricaine, République du Congo et Guinée équatoriale en Afrique centrale ; Au Burundi, en Tanzanie, au Rwanda et en Somalie en Afrique de l'Est. Parmi ces isolats collectés, 98 % (3179/3257) étaient génotypés de type sauvage *K13*, avec une mutation synonyme (non codante). Au total, 35 mutations uniques non synonymes de *K13* ont été identifiées et seules quelques-unes ont été validées comme médiateurs de résistance (21). Il est clairement connu que la diminution de la sensibilité de *Plasmodium* aux CTAs pourrait compromettre les progrès réalisés dans la lutte contre le paludisme.

La prévalence de la mutation *Pfcr76T* chez les enfants de moins de cinq ans (3,38 %) était très faible par rapport à celle du même groupe d'âge (38,6 %) en 2013, comme indiqué par les données de l'étude de 2020. Il existe une diminution considérable et continue de la prévalence de mutation *Pfcr76T* dans la zone CPS. Cette stratégie est mise en œuvre au Burkina Faso depuis 2014 et serait également appropriée pour prévenir le paludisme chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso.

Il est nécessaire de surveiller efficacement l'émergence et l'évolution de la résistance pour le contrôle et élimination du paludisme,

## **Conclusion**

Notre étude a montré une fois de plus qu'une diminution de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* associée à la résistance du parasite aux quinolones a été observée de 2013 (38,6 %) à 2020 (3,38 %). Cette étude a montré une diminution de la prévalence de la mutation *Pfcr76T* dans le contexte de la mise en œuvre des CTAs et de la CPS au Burkina Faso. La prévalence de la mutation *Pfcr76T* était très faible au cours de la CPS en 2020. Cependant, même si la mutation *Pfcr76T* persiste avec une faible prévalence, il convient d'envisager la surveillance des marqueurs moléculaires de résistance pour anticiper sur les échecs thérapeutiques qui pourraient compromettre une prise en charge appropriée des cas du paludisme.

## **Conflit d'intérêts**

Il n'y a aucun conflit d'intérêts entre les auteurs et les producteurs des produits. Cette recherche n'a pas été financée par la société productrice, mais plutôt par les efforts personnels des auteurs.

## **Reconnaissance**

Les réactifs suivants ont été obtenus via BEI Resources, NIAID, NIH : *Plasmodium falciparum*, souche Dd2, MRA-150, *Plasmodium falciparum*, souche HB3, MRA-102 apporté par David Walliker.

## **Consentement**

Un consentement éclairé écrit a été obtenu des participants et des parents/tuteurs de tous les participants avant l'inscription. Tous les cas de problèmes de santé ont été traités gratuitement selon les normes de soins locaux.

## **Approbation éthique**

Les deux protocoles d'étude ont été soumis et validés par le Ministère de la Santé du Burkina Faso le 07/07/2010 (avant la mise en place du comité d'éthique) et en 2020 (Délibération N° 2020 -5-092). Les participants ont été recrutés selon des critères d'inclusion et d'exclusion, sous réserve d'un consentement éclairé avant la participation.

## **Références bibliographiques**

- 1. Bruneel F, Laurent V, Bedos J, Wolff M.** Severe imported malaria in adults: What's up. *La Lett l'infectiologue*. 2012;27(6):234–8.
- 2. Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al.** Severe malaria - A case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: A case report. *Malar J*. 2010;
- 3. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C.** La résistance aux antipaludiques. *Rev Francoph des Lab*. 2010;
- 4. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al.** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria.[Erratum appears in *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1714]. *N Engl J Med*. 2009;
- 5. Warhurst DC.** Antimalarial drug discovery: Development of inhibitors of dihydrofolate reductase active in drug resistance. *Drug*

Discovery Today. 1998.

**6. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med.* 2001;

**7. Sirima SB, Tiono AB, Konaté A, Diarra A, Castelli F, Pinoges L, et al.** Efficacy of artesunate plus chloroquine for the treatment of uncomplicated malaria in children in Burkina Faso: A double-blind, randomized, controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;

**8. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al.** Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet.* 2004;

**9. Berzosa P, Esteban-Cantos A, García L, González V, Navarro M, Fernández T, et al.** Profile of molecular mutations in *pfhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, and *pfprt* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea). *Malar J.* 2017;16(1):1–10.

**10. Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemdé RT, D'Alessandro U, Ouédraogo JB.** Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfprt* T76 and *Pfmdr-1* Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Heal.* 2008;

**11. Tinto H, Zoungrana EB, Coulibaly SO, Ouedraogo JB, Traoré M, Guiguemde TR, et al.** Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine efficacy for uncomplicated malaria treatment and haematological recovery in children in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso during a 3-year period 1998-2000. *Trop Med Int Heal.* 2002;

**12. Tinto H, Sanou B, Dujardin JC, Ouédraogo JB, Van Overmeir C, Erhart A, et al.** Short report: Usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2005.

**13. Somé AF, Sorgho H, Zongo I, Bazié T, Nikiéma F, Sawadogo A, et al.** Polymorphisms in *K13*, *pfprt*, *pfmdr1*, *pfhfr*, and *pfdhps* in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Burkina Faso. *Parasite.* 2016;

**14. Sondo P, Derra K, Nakanabo SD, Tarnagda Z, Kazienga A,**

**Zampa O, et al.** Artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine therapies and selection of *pfcr* and *PfmdR1* alleles in Nanoro, Burkina Faso. PLoS One. 2016;

**15. Ndiaye M, Faye B, Tine R, Ndiaye JL, Lo A, Abiola A, et al.** Assessment of the molecular marker of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance (*Pfcr*) in Senegal after several years of chloroquine withdrawal. Am J Trop Med Hyg. 2012;

**16. Nikiema S, Sindié Sermé S, Sombié S, Diarra A, Bere Henry N, Salimata Badoum E, et al.** Prevalence of *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter (*Pfcr76T*) Mutation Associated with Antimalarial Drug Resistance in Two Different Epidemiological Setting (Banfora and Saponé) in Burkina Faso Few Years after the Implementation of Art. Int J Pathog Res. 2020;

**17. Tinto H, Ouédraogo JB, Erhart A, Van Overmeir C, Dujardin JC, Van Marck E, et al.** Relationship between the *Pfcr T76* and the *Pfmdr-1 Y86* mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. Infect Genet Evol. 2003;

**18. ABDEL-AZIZ MH.** Etude de la relation entre la présence de la *Plasmodium falciparum* mutation *Pfcr76T* et l'efficacité de l'association artesunate amodiaquine dans le traitement du paludisme simple à au Burkina Faso. Mémoire du DEA, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso. 2008;

**19. Mukherjee A, Daniels R, Amaratunga C, Woodrow CJ, Ashley E, Tripura R, et al.** Relationships between k13-propeller alleles and artemisinin susceptibility in cambodian and senegalese *Plasmodium falciparum* isolates. Am J Trop Med Hyg. 2014;

**20. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al.** A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505 (7481):50–5.

**21. Stokes BH, Dhingra SK, Rubiano K, Mok S, Straimer J, Gnädig NF, et al.** *Plasmodium falciparum* k13 mutations in africa and asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. Elife. 2021.