

Sensibilité *ex vivo* de *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine et prévalence des mutations *pfert*-76T et *pfmdr1*-86Y à Bobo-Dioulasso.

Thomas BAZIE^{1*}, A. Fabrice SOME^{1*}, E Catherine NEYA¹,
L. Perside PABAME^{1,3}, Zachari KABRE¹, Aminata FOFANA¹,
Myreille SOME¹, Tegawinde Josue KAGAMBEGA¹,
Adrien Marie Gaston BELEM²,
Jean-Bosco OUEDRAOGO³.

Résumé

Le paludisme demeure une cause majeure de morbidité et de mortalité au Burkina Faso. Le traitement du paludisme simple est actuellement basé essentiellement sur l'utilisation de l'artéméther-luméfantine, la dihydro-artémisinine et l'artésunate-pyronaridine. La pharmacovigilance des antipaludiques disponibles demeure une grande priorité. Dans cette étude, nous avons évalué la sensibilité *ex vivo* de *P. falciparum* à la Chloroquine et la prévalence des mutations *pfert*-76T et *pfmdr1*-86Y à Bobo-Dioulasso. Pour mesurer la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, nous avons collecté du sang veineux de 92 sujets atteints de paludisme dans les centres de santé de Sakaby et Hamdallaye entre juillet et décembre 2022. Nous avons calculé les valeurs CI₅₀ suivant un test standard d'inhibition de la croissance de 72 heures. L'ADN du parasite extrait au Chelex100 a été génotypé pour déterminer la prévalence des mutations *pfert* K76T et *pfmdr1* N86Y. Au total 71/92 (77%) échantillons ont été mis en culture avec succès. La CI₅₀ médiane de 21 nM avec 5 échantillons ayant des valeurs de CI₅₀ supérieures ou égales à 100nM, valeur seuil de la chloroquinorésistance de *P. falciparum*. La plupart des échantillons présentaient des génotypes de type sauvage avec 87% pour *pfert*-K76 et 96 % pour *pfmdr1*-N86. Contrairement à *pfmdr1*-86Y, la présence de la mutation *pfert*-76T était fortement associée à une diminution de la sensibilité à la chloroquine (p= 0,001 et OR = 0,03). Nos résultats indiquent d'excellentes sensibilités des isolats de *P.falciparum* à la CQ avec une faible prévalence des mutations *pfert*-76T et *pfmdr1*-86Y associés à la chloroquinorésistance.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, chloroquine, *Pfert*, *Pfmdr1*, *ex vivo*, Burkina Faso

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Direction Régionale de l'Ouest (IRSS-DRO), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

² Université NAZI BONI, Bobo-Dioulasso

Auteur correspondant : Thomas BAZIE, +22675553172, ORCID : <https://orcid.org/0009-0002-5518-8066>

³ Institut des Sciences et Techniques, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

***Ex vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine and prevalence of *pfert*-76T and *pfmdr1*-86Y mutations in Bobo-Dioulasso.**

Abstract

Malaria remains a major cause of morbidity and mortality in Burkina Faso. Current treatment of uncomplicated malaria is based essentially on artemether/lumefantrine, dihydro-artemisinin and artesunate-pyronaridine. Monitoring the effectiveness of available antimalarial drugs remains a high priority. In this study, we assessed *ex vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine and the prevalence of *pfert*-76T and *pfmdr1*-86Y mutations in Bobo Dioulasso. We sampled venous blood from 92 malaria patients attending the Sakaby and Hamdallaye health centers between July and December 2022. IC₅₀ values were calculated using a standard 72-hour growth inhibition test. Parasite DNA extracted by the Chelex100 method and amplified using nested PCR followed by enzymatic digestion to determine the prevalence of *pfert*K76T and *pfmdr1*N86Y mutations. Overall, 71/92 (77%) samples were successfully grown. The median IC₅₀ was 21nM (9 -29) with 5 samples (7.04%) having IC₅₀ values greater than or equal to 100nM, the value considered as threshold for *P. falciparum* resistance to chloroquine. The majority of samples showed wild-type genotypes, with 87% for *pfert*-K76 and 96% for *pfmdr1*-N86. Unlike *pfmdr1*-86Y, the presence of *pfert*-76T mutation was highly associated with reduced sensitivity to chloroquine ($p = 0.001$ and OR = 0.03). Our findings suggest excellent susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Bobo-Dioulasso to CQ, with low prevalence of *pfert*-76T and *pfmdr1*-86Y mutations associated with chloroquine resistance.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Chloroquine, *pfert*, *pfmdr1*, *ex vivo*, Burkina Faso

Introduction

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* demeure la principale cause de mortalité et de morbidité au Burkina Faso avec environ 37 % des cas de consultations et 15% des décès (1). Depuis 2005 à la suite de l'apparition de la résistance à la chloroquine (CQ) et à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), arthémether-lumefantrine (AL) et artésunate-amodiaquine (AS-AQ) ont été les traitements de première ligne du paludisme simple (2). Très récemment, la dihydroartémisine (DHA-PQ) et l'artésunate-pyronaridine (AS-Pyr) ont été introduites dans l'arsenal thérapeutique du paludisme suite au retrait de AS-AQ du fait de l'utilisation de AQ dans la chimioprévention saisonnière du paludisme (CPS) (3, 4). Depuis, de nombreuses études ont démontré l'efficacité des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) au Burkina Faso (5-8), bien qu'une récente étude ait rapporté

une faible efficacité de AL (9). Malgré l'excellente efficacité des CTAs rapportée au Burkina Faso, l'émergence et la propagation de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la CQ, à la SP et plus récemment à l'artémisinine et aux médicaments partenaires des CTAs restent une préoccupation qui mettra grandement à l'épreuve le contrôle de la maladie. En prenant en compte l'historique de l'émergence et de la propagation de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques, la surveillance de l'efficacité des antipaludiques demeure une priorité dans les pays endémiques.

Les méthodes actuelles de surveillance de la résistance aux antipaludiques reposent principalement sur des études d'efficacité thérapeutique *in vivo*, des études de sensibilité parasitaire *in vitro/ex vivo* et la détection des mutations de gènes ou variation de nombre de copie dans le génome du parasite associées à une réduction de la sensibilité des parasites aux médicaments antipaludiques (10). Les études d'efficacité thérapeutique *in vivo* et les études *in vitro/ex vivo* sont laborieuses en termes de temps et de coût et nécessitent des laboratoires hautement équipés, mais leurs avantages sont la pertinence clinique directe des résultats et la disponibilité des informations sur la sensibilité des parasites aux antipaludiques (11, 12). Les études de biologie moléculaire permettent d'établir les relations entre la génétique du parasite et la résistance aux médicaments par la détection de simple mutation ou du nombre de copie de gène associés à une diminution de la sensibilité des parasites aux antipaludiques (13). Dans ce contexte, la combinaison de différentes méthodes telles que les études *ex vivo* et moléculaires peut offrir une meilleure évaluation de l'efficacité des médicaments antipaludiques permettant de prédire toute émergence de résistance aux médicaments.

La CQ est l'un des antipaludiques ayant joué un rôle majeur dans la lutte contre le paludisme au Burkina Faso avant d'être remplacée par les CTAs depuis l'apparition de la chloroquinorésistance (2). Des études récentes ont par ailleurs démontré un retour de sensibilité de *P. falciparum* à la CQ dans plusieurs pays après le retrait de la molécule dans les directives nationales de prise en charge du paludisme (14, 15). Le mécanisme biochimique de la chloroquinorésistance, bien qu'il soit complexe à élucider, toutes les théories établies (16-18) s'accordent sur le fait que la résistance des parasites est due à une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive principalement associée à la mutation *pfcr1-76T*. La présente étude vise à évaluer la sensibilité *ex vivo* de *Plasmodium falciparum* à la CQ et

déterminer la prévalence des mutations *pfprt*-76T et *pfmdr1*-86Y à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

I. Matériels et Méthodes

I.1. Collecte des échantillons biologiques

Nous avons prélevé du sang veineux chez des sujets âgés de plus de 6 mois atteints de paludisme se présentant pour une consultation dans les Centres de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) de Sakaby et de Hamdallaye à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso entre juillet et décembre 2022. Bobo-Dioulasso est la seconde ville la plus peuplée située à l'Ouest du Burkina Faso. Les sujets se présentant avec une fièvre (température axillaire 37,5) ou une histoire de fièvre dans les dernières 24 heures ont été examinés pour l'enrôlement avec un test de diagnostic rapide du paludisme et une goutte épaisse /frottis sanguin.

Pour tous les sujets ayant une mono-infection à *P. falciparum* après lecture de la goutte épaisse/frottis et une densité parasitaire supérieure à 1%, nous avons collecté 3-5ml de sang veineux dans des tubes EDTA après l'administration et les signatures de consentements éclairés par les parents ou tuteurs (pour les enfants de moins de 10 ans), ou d'assentiment par les enfants de 10-16 ans. Les sujets ayant déclaré avoir reçu un traitement antipaludique dans les 30 derniers jours étaient exclus de l'étude. La densité parasitaire a été déterminée à partir de la goutte épaisse grâce à un microscope (Olympus CX23 ; Olympus Corp, Tokyo, Japan). Des gouttes de sang d'environ 25 µL ont été séchées sur du papier buvard pour les analyses de biologie moléculaire. Les prélèvements de sang veineux ont été transportés dans le laboratoire de culture cellulaire de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) de Bobo-Dioulasso.

I.2. Lavage des hématies, culture ex vivo et détermination des CI50 des isolats.

Le sang prélevé a été centrifugé à 2000 tr/min pendant 10 min à 4°C, le plasma et la couche leucocytaire ont été retirés et le culot érythrocytaire a été lavé trois fois avec le milieu RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ce culot a été remis en suspension dans un milieu complet composé de RPMI 1640 avec 25 mM d'HEPES, 24 mM de NaHCO₃, 0,1 mM d'hypoxanthine, 10 µg/mL de gentamicine et 0,5 % d'AlbuMAX II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pour produire un hémocrite de 50%.

La sensibilité à la CQ a été mesurée à l'aide d'un test d'inhibition de la croissance sur microplaque de 72 heures avec détection du colorant « SYBR Green », comme décrit précédemment (19, 20) La CQ fournie par Medicines for Malaria Venture (Genève, Suisse), a été dissoute dans de l'eau ultra pure à la concentration de 10 mM et conservée à -20°C. Une solution de travail (concentration 10µM) est ensuite préparée en diluant 2 µL de solution stock avec 498 mL de milieu RPMI. Par la suite, on place 75 µL de solution de chloroquine (C =10µM) dans les puits de la colonne 1 de la plaque de culture et 50µL de RPMI dans les puits des colonnes 2 jusqu'à la colonne 12. Une dilution en série au 1/3 est réalisée de la colonne 2 jusqu'à la colonne 10 (Tableau 1). Les cultures ont été ajustées à 0,2 % de parasitémie et à 2 % d'hématocrite en utilisant du sang de groupe O⁺ non infecté, obtenu auprès du centre national de transfusion sanguine de Bobo-Dioulasso, jusqu'à un volume total de 200 µL par puits. Les plaques de culture ont été maintenues à 5 % de CO₂, 5 % d'O₂ et 90 % de N₂ pendant 72 h à 37 °C dans un incubateur modulaire humidifié. Après 72 h, les plaques de culture sont conservées à -20°C jusqu'à la lecture. Pour la lecture, les plaques sont décongelées, les puits remis en suspension et 100 µL de culture par puits ont été transférés et mélangés avec 100 µL de tampon de lyse SYBR Green contenus dans des plaques noires à 96 puits. Les plaques noires ont été par la suite incubées pendant 1 heure dans l'obscurité à température ambiante et la fluorescence a été mesurée avec un lecteur de plaques FLUOstar Omega (BMG LabTech, Cary, Caroline du Nord, USA ; excitation à 485 nm et émission à 530 nm). Les souches de contrôle en laboratoire de *Plasmodium falciparum* Dd2 (MRA-156) et 3D7 (MRA-102) (BEI Resources, Manassas, VA, USA) ont été testées régulièrement au cours de la période d'étude. Les valeurs CI₅₀ ont été dérivées en traçant l'intensité de fluorescence en fonction du Log de la concentration du médicament et en les ajustant à une courbe non linéaire à l'aide d'une équation de Hill à quatre paramètres dans Prism (logiciel GraphPad, version 9.0).

I.3. Génotypages des marqueurs moléculaires

L'ADN parasitaire a été extrait par la méthode du Chelex100 décrite précédemment (21) suivi de l'analyse des génotypes des codons *pfprt* K76T et *pfmdr1* N86Y par la technique de PCR nichée suivie d'une restriction enzymatique (RFLP en anglais) comme précédemment décrite (22, 23).

Tableau I : Plan des microplaques pour la mise en culture parasitaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
B	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
C	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
D	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
E	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
F	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
G	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
H	C	C/3	C/9	C/27	C/81	C/243	C/729	C/2187	C/6561	C/19683	PC	NC
C = 75 µL du médicament à 10µM												
PC = Contrôle positif , 50 µL du milieu de culture complet (Sans médicament)												
NC = Contrôle négatif 50 µL de milieu de culture complet (Sans médicament)												

I.4. Analyse Statistique des données

Les résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft office Excel 2019 et analysés avec le logiciel R.4.1.0. Les tests de Chi-carrée et de régression logistique ont été utilisés respectivement pour comparer les proportions avec un seuil de significativité de 5% et vérifier les corrélations entre la sensibilité *ex vivo* à la CQ et les mutations.

I.5. Considération éthique

Le protocole de l'étude ainsi que tous les relatifs ont reçu l'approbation du comité d'éthique Institutionnel pour la Recherche en Santé de l'IRSS (CEIRES ; N°A 0025/2018 du 16 Novembre 2018). Tous les participants ont signé un consentement éclairé ou assentiment avant l'inclusion à l'étude.

II. Résultats

II.1. Caractéristiques de base de la population d'étude

Au total, 92 sujets atteints de paludisme avec une densité parasitaire médiane de 1,54% ont été reçus dans les CSPP de Sakaby et de

Hamdallaye et inclus dans l'étude. La majorité des participants était de sexe masculin avec une moyenne d'âge de 14 ans (Tableau 2).

Tableau II : Caractéristiques de base de la population d'étude

Effectif Total	Site d'étude		Genre N(%)		Age (an) Médian (Min-Max)	Parasitémie Médiane, (SD)
	Sakaby	Hamdallaye	Masculin	Feminin		
92	43	49	56 (60,87)	36 (39,13)	14 (5-60)	1,54% [1,06-2,78]

II.2. Sensibilité ex vivo des souches parasitaires à la Chloroquine

Sur un total de 92 échantillons, nous avons pu mettre en culture avec succès 71 échantillons. La CI_{50} médiane de 21 nM (9 et 29) (Tableau 3). Seuls 5 échantillons (7,04%) avaient des valeurs de CI_{50} supérieures ou égales à 100nM, une valeur considérée comme seuil de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (figure 1). Les analyses des souches de laboratoire 3D7 et Dd2 ont montré des résultats similaires à ceux déjà publiés (20).

Tableau III : CI_{50} Médian des isolats de terrain et de laboratoire

Medicament	Origine des parasites	N	Median CI_{50} (nM)	IQR	Min-Max(nM)
Chloroquine	Isolats de terrain	71	21	9-29	3-263
	3D7	1	8.9	-	5-12
	Dd2	1	107	-	100-350

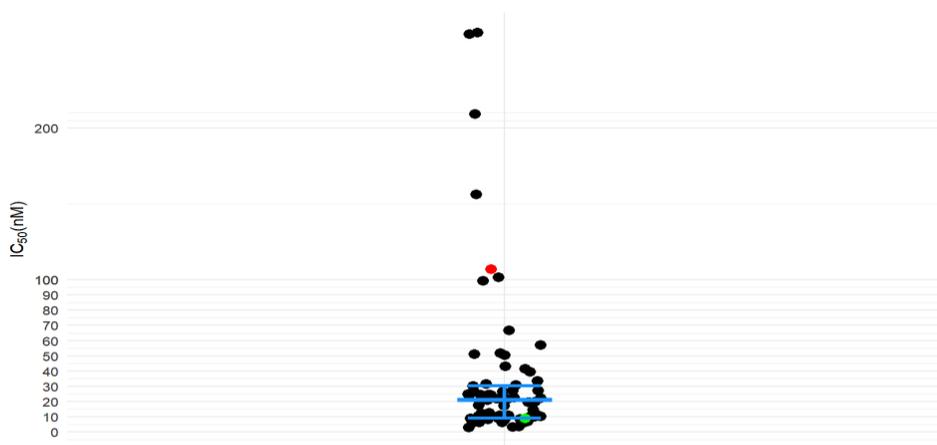


Figure 1 : Sensibilité *ex vivo* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ; Chaque point noir représente la CI_{50} d'un seul isolat de terrain, le point rouge correspond à la CI_{50} du contrôle résistant (Dd2) le point vert correspond à la CI_{50} du contrôle sensible sauvage (3D7). La Barre bleue représente la Médiane et l'intervalle interquartile

II.3. Prévalence de la mutation *pfmdr1-86N* et *pfprt-76T*

Sur un total de 92 échantillons analysés avec succès, nos résultats montrent une proportion significativement faible des mutations *pfprt-76T* (10.87%) et *pfmdr1-86Y* (3.26%) associées à la résistance à la CQ. Pour l'analyse de la corrélation entre la sensibilité *ex vivo* et la présence des mutations, les échantillons ayant un génotype mixte seront considérés comme des mutants (figure 2).

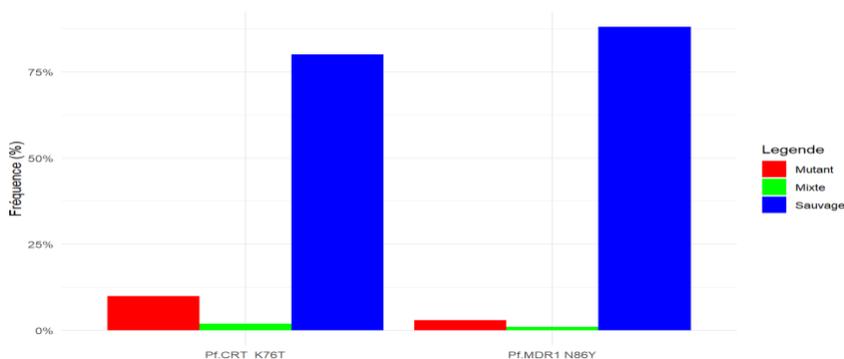


Figure 2 : Prévalence des mutations *pfmdr1-86Y* et *pfprt-76T*

II.4. Corrélation entre la présence des mutations *pfcr*t-76T et *pfmdr*1-86Y et la sensibilité *ex vivo* de *P. falciparum*

Nous avons évalué sur le total des 71 échantillons mis en culture avec succès la relation entre la présence des mutations *pfcr*t-76T et *pfmdr*1-86Y et la sensibilité *ex vivo* à la CQ. Nos résultats indiquent que contrairement à la mutation *pfmdr*1-86Y ($p=0,9$; figure 4) la présence de la mutation *pfcr*t-76T était significativement associée à une diminution de la sensibilité à la CQ ($p=0,001$ et $OR = 0,03$, figure 3).

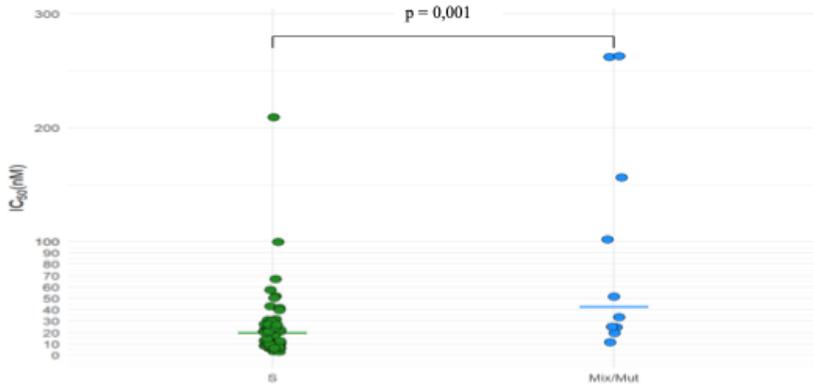


Figure 3 : Corrélation entre la présence de la mutations *pfcr*t-76T et la sensibilité *ex vivo* de *P. falciparum*. S= Sauvage, Mix/Mut = Mixte/Mutant et les points (bleu et vert) représentent les valeurs des CI₅₀ de chaque isolat.

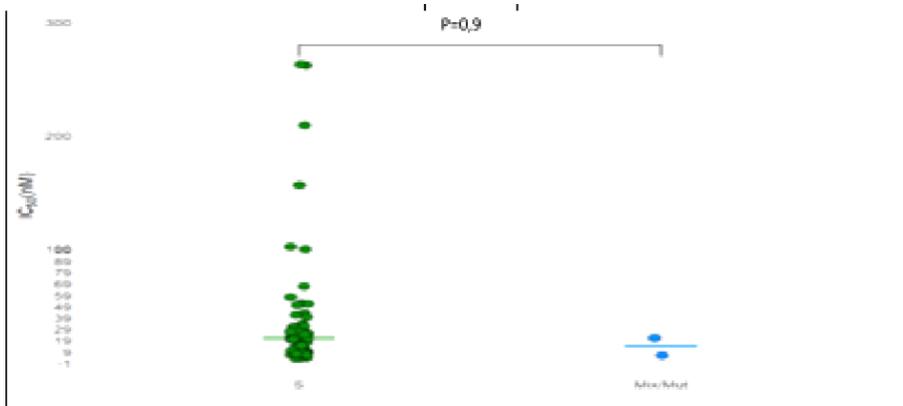


Figure 4 : Corrélation entre la présence de la mutation *pfmdr*1-86Y et la sensibilité *ex vivo* de *P. falciparum* ; S= Sauvage, Mix/Mut = Mixte/Mutant et les points (bleu et vert) représentent les valeurs des CI₅₀ de chaque isolat.

III. Discussion

La résistance aux médicaments antipaludiques demeure l'un des plus grands défis du traitement et de la prévention contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* dans le monde (24, 25). Au Burkina Faso, bien que de nombreuses études aient démontré l'efficacité des antipaludiques dans le traitement ou la prévention contre le paludisme (7, 26, 27), une récente étude a rapporté une faible efficacité des combinaisons thérapeutiques de première ligne (9). L'évaluation de la sensibilité *ex vivo* de *Plasmodium falciparum* aux médicaments antipaludiques, une méthode très limitée dans le pays, demeure d'une grande importance. Dans cette étude, nous avons analysé la sensibilité *ex vivo* à la chloroquine d'isolats de *Plasmodium falciparum* fraîchement collectés et avons déterminé la prévalence des mutations *pfprt*-76T et *pfmdr1*-86Y à Bobo-Dioulasso, au Burkina Faso.

Nous avons démontré que les isolats de *P. falciparum* circulant à Bobo-Dioulasso sont pour la plupart très sensibles à la chloroquine qui n'est plus utilisée dans le pays depuis 2005. Près de 92,96 % des isolats étaient sensibles avec seulement 5 isolats ayant une valeur de CI_{50} supérieure à 100nM, la valeur seuil de la résistance à la CQ. La prévalence de la résistance *ex vivo* à la CQ rapportée dans notre étude est inférieure à la prévalence de la chloroquinorésistance précédemment rapportée dans la même zone, bien que la méthode et la taille de l'échantillon ne soient pas comparables (4, 28). Ces données qui sont comparables aux données récentes de notre équipe (29) indiquent que la CQ pourrait devenir une bonne alternative en tant que médicament partenaire des CTAs, avec l'avantage d'une fabrication facile et d'un faible coût. La surveillance systématique de la résistance à la CQ devrait être une priorité élevée.

Cette étude *ex vivo* présente tout de même certaines limites. Les tests de sensibilité aux médicaments *ex vivo* sont intrinsèquement imprécis et les résultats de la CI_{50} peuvent être affectés par une croissance variée en culture et par l'incapacité de répéter les tests pour améliorer la précision. De plus, pour améliorer la fiabilité, nous avons limité notre étude aux isolats présentant des parasitémies élevées (1%); ces résultats pourraient ne pas refléter ceux des infections de faible densité. Enfin, dans les contextes de transmission élevée du paludisme, les infections à *P. falciparum* sont généralement polyclonales et nos valeurs de sensibilité *ex vivo* représentent souvent une moyenne des résultats pour des clones en compétition en culture.

Les résultats du génotypage des gènes associés à la sensibilité aux médicaments ont montré une très faible prévalence des mutations *pfcr*-76T et *pfmdr*1-86Y associés à la résistance à la CQ. Ces résultats sont conformes avec les données récentes (30) et aussi avec nos résultats *ex vivo* (29).

La faible proportion des mutations associées à la chloroquinorésistance pourrait également s'expliquer par le retrait de la CQ et de AS-AQ dans les directives de prises en charge du paludisme au Burkina Faso et partant de ce fait, une diminution de la pression médicamenteuse dans la population (3, 31). Cependant, la persistance des mutants *pfcr*-76T et *pfmdr*1-86Y dans la population peut également s'expliquer par le fait d'utilisation frauduleuse de la chloroquine (32) ou du fait d'une résistance croisée avec des médicaments ayant une structure similaire à la CQ (28).

L'évaluation de la corrélation entre la présence des mutations *pfcr*-76T et *pfmdr*1-86Y et le phénotype *ex vivo* à la CQ a démontré que contrairement à la mutation *pfmdr*1-86Y, la présence de la *pfcr*-76T est fortement associée à une diminution de la sensibilité à la CQ. Ces résultats corroborent avec ceux des études antérieures démontrant une association entre la présence des mutations associées aux aminoquinoléines (20). Le manque de corrélation entre la présence de la mutation *pfmdr*1-86Y et le phénotype *ex vivo* de la CQ pourrait s'expliquer par le faible nombre de mutants reporté dans cette étude.

Conclusion

Nos résultats suggèrent que les isolats de *Plasmodium falciparum* circulant à Bobo-Dioulasso sont globalement très sensibles à la CQ, avec une faible prévalence des mutations *pfcr*-76T et *pfmdr*1-86Y. Cependant, les raisons de s'inquiéter sont entre autres l'augmentation de la prévalence de mutations médiatrices de la résistance partielle à l'artémisinine et aux antifolates, les études faisant état d'une diminution de l'efficacité des CTAs, et la probabilité que l'utilisation continue des CTAs pour traiter le paludisme et la SP-AQ pour la CPS pourrait éventuellement conduire à une diminution de la sensibilité des parasites du paludisme aux antipaludiques importants. Ainsi, la surveillance *ex vivo* continue de la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques actuels demeure d'une grande importance.

Contribution des auteurs

AFS, JBO, ont conçu l'étude. AFS, KZ, FA, et BT ont suivi les activités sur le terrain et en laboratoire. AFS, a fourni des conseils techniques pour la culture et le génotypage. AFS, KZ, FA, et BT ont effectué les travaux de terrain et les analyses de laboratoire. TB a effectué l'analyse statistique des résultats. TB a rédigé la première version du manuscrit. AFS, JBO, ont révisé le manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale de ce manuscrit.

Remerciements et Source de financement

Nous remercions les participants, les parents ou tuteurs pour leur participation et le personnel des deux centres de santé pour leurs assistances dans la collecte de échantillons. Ce travail a été financé par le National Institutes of Health (subventions R01AI139179 et R01AI075045) à travers l'Université de Californie , San Francisco (UCSF) et Medicines for Malaria Venture (MMV RD/18-0066).

Conflit d'intérêt

Aucun

Références bibliographiques

1. **MS.** Annuaire Stastique 2021. Ministère de la santé 2021.
2. **Gansane A, Nebie I, Soulama I, Tiono A, Diarra A, Konate AT, et al.** [Change of antimalarial first-line treatment in Burkina Faso in 2005]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2009;102(1):31-5.
3. **Ministère de la Santé et de l'Hygène Publique.** Directives nationales de prise en charge du Paludisme. SP-Palu. Ouagadougou, Burkina Faso. 2021.
4. **Tinto H, Bonkian LN, Nana LA, Yerbanga I, Lingani M, Kazienga A, et al.** *Ex vivo* anti-malarial drugs sensitivity profile of *Plasmodium falciparum* field isolates from Burkina Faso five years after the national policy change. *Malar J.* 2014;13:207.
5. **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.

6. **Zongo I, Compaore YD, Nikiema F, Zongo M, Barry N, Some FA, et al.** Efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine as first line therapy of uncomplicated malaria in Burkina Faso, 11 years after policy change. *Pan Afr Med J.* 2020;35:68.
7. **Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, Guiguemde RT, 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.
8. **Zongo I, Some FA, Somda SA, Parikh S, Rouamba N, Rosenthal PJ, et al.** Efficacy and day 7 plasma piperaquine concentrations in African children treated for uncomplicated malaria with dihydroartemisinin-piperaquine. *PLoS One.* 2014;9(8):e103200.
9. **Gansane A, Moriarty LF, Menard D, Yerbanga I, Ouedraogo E, Sondo P, et al.** Anti-malarial efficacy and resistance monitoring of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine shows inadequate efficacy in children in Burkina Faso, 2017-2018. *Malar J.* 2021;20(1):48.
10. **Vestergaard LS, Ringwald P.** Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(6 Suppl):153-9.
11. **Bacon DJ, Jambou R, Fandeur T, Le Bras J, Wongsrichanalai C, Fukuda MM, et al.** World Antimalarial Resistance Network (WARN) II: in vitro antimalarial drug susceptibility. *Malar J.* 2007;6:120.
12. **WHO.** Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva; 2009.
13. **Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, et al.** World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J.* 2007;6:121.
14. **Mulenga MC, Sitali L, Ciubotariu, II, Hawela MB, Hamainza B, Chipeta J, et al.** Decreased prevalence of the Plasmodium falciparum Pfert K76T and Pfmdr1 and N86Y mutations post-chloroquine treatment withdrawal in Katete District, Eastern Zambia. *Malar J.* 2021;20(1):329.
15. **Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Tachibana SI, Ikeda M, Yamauchi M, Katuro OT, et al.** Recovery and stable persistence of

chloroquine sensitivity in *Plasmodium falciparum* parasites after its discontinued use in Northern Uganda. *Malar J.* 2020;19(1):76.

16. Bray PG, Mungthin M, Hastings IM, Biagini GA, Saidu DK, Lakshmanan V, et al. PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol.* 2006;62(1):238-51.

17. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* 2000;6(4):861-71.

18. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 2007;23(7):332-9.

19. Tumwebaze P, Conrad MD, Walakira A, LeClair N, Byaruhanga O, Nakazibwe C, et al. Impact of antimalarial treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites isolated from ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3018-30.

20. Tumwebaze PK, Katairo T, Okitwi M, Byaruhanga O, Orena S, Asua V, et al. Drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in eastern Uganda: a longitudinal phenotypic and genotypic study. *Lancet Microbe.* 2021;2(9):e441-e9.

21. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):565-8.

22. Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfert and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis.* 2001;183(9):1417-20.

23. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol.* 1998;89(1):1-8.

24. Asih PBS, Rozi IE, Dewayanti FK, Wangsamuda S, Zulfah S, Robaha M, et al. Efficacy and safety of dihydroartemisinin-

piperazine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Papua and Sumatra, Indonesia. *Malar J.* 2022;21(1):95.

25. Conrad MD, Rosenthal PJ. Antimalarial drug resistance in Africa: the calm before the storm? *Lancet Infect Dis.* 2019;19(10):e338-e51.

26. Konate AT, Yaro JB, Ouedraogo AZ, Diarra A, Gansane A, Soulama I, et al. Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Burkina Faso: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 2011;8(2):e1000408.

27. Some AF, Zongo I, Compaore YD, Sakande S, Nosten F, Ouedraogo JB, et al. Selection of drug resistance-mediating *Plasmodium falciparum* genetic polymorphisms by seasonal malaria chemoprevention in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3660-5.

28. Tahita MC, Tinto H, Yarga S, Kazienga A, Traore Coulibaly M, Valea I, et al. Ex vivo anti-malarial drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from pregnant women in an area of highly seasonal transmission in Burkina Faso. *Malar J.* 2015;14:251.

29. Some AF, Conrad MD, Kabre Z, Fofana A, Yerbanga RS, Bazie T, et al. Ex vivo drug susceptibility and resistance mediating genetic polymorphisms of *Plasmodium falciparum* in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024:e0153423.

30. Tarama CW, Soré H, Siribié M, Débé S, Kinda R, Ganou A, et al. *Plasmodium falciparum* drug resistance-associated mutations in isolates from children living in endemic areas of Burkina Faso. *Malar J.* 2023;22(1):213.

31. Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique. Directives Nationales de PEC du paludisme. 2017.

32. Frosch AE, Venkatesan M, Laufer MK. Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malar J.* 2011;10:116.