

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité en **EPIDEMIOLOGIE**

Ecole doctorale Pierre Louis de santé publique
ED 393 Epidémiologie et Science de l'Information Biomédicale

Thèse préparée dans le cadre du Réseau doctoral en santé publique animé par l'**EHESP**

Présentée par

Mlle Myriam GHARBI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**PALUDISME DES VOYAGEURS : ÉVALUATION DU RÔLE
SENTINELLE DANS LA RÉSISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES**

soutenue le **12 Juin 2013**

devant le jury composé de :

M. le Professeur Jacques LE BRAS	Directeur de thèse
M. le Docteur Philippe GUERIN	Directeur de thèse
M. le Professeur Jean-Claude DESENCLOS	Rapporteur
M. le Professeur Christophe ROGIER	Rapporteur
M.le Professeur Jean DUPOUY-CAMET	Examineur
M.le Professeur Arnaud FONTANET	Examineur
M.le Professeur Alain-Jacques VALLERON	Examineur

A Joe

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont dans un premier temps à mes deux directeurs de thèse, Pr Jacques Le Bras et Dr Philippe Guérin, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu et qui m'ont témoigné une grande confiance depuis le début de ce projet. Vous avez su me guider dans le monde du paludisme, me pousser à prendre des initiatives et m'ouvrir les portes de deux grands réseaux : le Centre National de Référence du Paludisme (CNR Palu) et le WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN). En me donnant les moyens de partager ma thèse entre Paris et Oxford, j'ai beaucoup évolué sur le plan professionnel et personnel. Merci Jacques d'avoir accepté le défi d'encadrer une thèse d'épidémiologie. J'étais très heureuse de vous entendre partager avec moi votre grande expérience du paludisme des voyageurs. Et c'est un honneur d'être votre dernière étudiante. Merci Philippe pour ta positivité, ton optimisme et ta bonne humeur. A chacune de nos rencontres, tout me semblait possible et je repartais avec un enthousiasme décuplé pour la suite de ma thèse.

Je remercie tous les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de prendre de leur temps, que je sais très précieux, pour la lecture de ce travail: Pr Jean-Claude Desenclos et Pr Christophe Rogier, en tant que rapporteurs, Pr Jean Dupouy-Camet, Pr Arnaud Fontanet et Pr Alain-Jacques Valleron en tant qu'examineurs. Arnaud, je souhaite te remercier tout particulièrement. Tu as su m'orienter dans mes choix quand j'en avais le plus besoin et augmenter mon intérêt pour cette discipline passionnante qu'est l'épidémiologie des maladies tropicales lors de mon expérience au sein du réseau Pasteur.

A Paris

Je remercie Pr Michel Cot et Pr Philippe Deloron, de m'avoir ouvert les portes de leur unité, l'UMR 216 : Mère et enfant face aux infections tropicales. Merci Michel pour ta gentillesse et ton soutien. J'ai beaucoup apprécié nos échanges à Barcelone, Philadelphie ou Atlanta.

Je remercie tous les membres, cliniciens et biologistes, du CNR, en particulier sa nouvelle directrice Sandrine Houzé, Martin Danis, Bruno Pradines, Eric Kendjo et Marc Thellier, qui m'ont permis l'accès aux données du plus grand système de surveillance national du paludisme d'importation.

Merci à mes collègues de Bichat, en particulier Véronique, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu et Sabina pour tes conseils, ton soutien et tes grandes qualités humaines.

Je remercie toute l'équipe de l'UMR216. C'était un plaisir de travailler dans une ambiance si chaleureuse avec une pensée particulière à tous les doctorants ou ancien doctorants, Bibiche, Célia, Ghislain, Abdoulaye, Géraud, Agnès qui ont partagé un bout de cette épreuve avec moi. Et merci Valérie et Audrey pour votre écoute et vos précieux conseils.

Un grand merci au Pr Nathalie Seta et au Pr France Mentré pour leur grande gentillesse, leur disponibilité, leurs conseils avisés et leur soutien ; ainsi qu'au Pr Alfred Spira, qui m'a apporté ses conseils éclairés tout au long de mon parcours de Santé Publique.

Je remercie mon oncle, le Pr Benarous. Richard, merci de m'avoir transmis ton amour pour la recherche dans le domaine des maladies infectieuses, et de m'avoir guidée toutes ces longues années.

A Oxford

Je souhaitais tout particulièrement remercier Dr Jennifer Flegg pour son expertise et sa grande contribution à ce travail. Merci Jen pour ta gentillesse et ta disponibilité tout au long de cette thèse

Et un grand merci à toute l'équipe WWARN, plus particulièrement ceux qui ont partagé mon bureau d'Oxford pendant plusieurs mois, Clarissa, Prabin, Aimee, Patrice puis Christian et Georgina. A Sam, Ruth, Leema, Emmanuelle qui ont facilité mon intégration à Oxford.

A Trudy et Stewart, ma nouvelle famille de Cowley.

A Samia et mes deux adorés Marwan et Mehdi, à Lulu et Juju et à tout le reste de ma famille et amis, que ce soit en France, en Italie ou en Tunisie. Ils m'ont toujours tous soutenue et accompagnée pour aller au bout de mes projets.

En mémoire à mon oncle épidémiologiste Pr Paul Schafer.

A mes parents et à mon frère Sélim, pour tout l'amour qu'ils m'ont toujours donné.

For my beloved Joseph

RESUME DE LA THESE

Face à l'émergence de résistance de *Plasmodium falciparum* à l'ensemble des antipaludiques actuellement disponibles, la surveillance de l'efficacité thérapeutique de ces molécules est une priorité de santé publique. Les méthodes d'évaluation de la résistance sont complexes, rendant difficile leur mise en application sur le terrain. Certaines zones endémiques, n'ayant pas les capacités d'intégrer une surveillance de routine, disposent d'une information limitée sur l'efficacité des traitements utilisés. La multiplication des voyages est un facteur favorisant la diffusion des infections à *Plasmodium* et des résistances. Néanmoins, les voyageurs pourraient constituer une bonne population sentinelle de l'échec thérapeutique lié à une résistance de par leur faible immunité anti-palustre et leur faible risque de réinfection. Nous explorons l'utilisation de la surveillance du paludisme des voyageurs dans la détection de l'émergence et le suivi des tendances de la résistance en zone endémique. Les données exploitées proviennent principalement du Centre National de Référence du Paludisme, France, de 2000 à 2011.

Premièrement, nous investiguons si la surveillance du paludisme d'importation serait un bon indicateur des évolutions de la résistance sur le terrain. Puis, la surveillance des voyageurs est testée pour deux différentes applications: la détection de l'émergence de la résistance à la chloroquine en Haïti et l'évolution de la résistance à la chloroquine consécutive aux changements de politique thérapeutique en Afrique.

Notre travail confirme l'utilité d'un système de surveillance du paludisme des voyageurs complémentaire aux études de terrain pour faciliter une réponse adaptée par les décideurs des politiques de santé.

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*, paludisme, voyageurs, antipaludiques, résistance, système de surveillance, combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, marqueurs moléculaires de résistance, sensibilité *in vitro*

TITLE

Malaria of travellers: assessment of the sentinel role in the antimalarial drug resistance

ABSTRACT

There are growing concerns about the emergence of resistance of *Plasmodium falciparum* to all the antimalarial drugs currently available, including the artemisinin-based combination therapies (ACTs). Monitoring the therapeutic efficacy of these drugs has become a public health priority. The methods for assessing the antimalarial drug resistance are complex, making their implementation within endemic countries difficult. Some endemic areas, which do not have the logistic and financial capacity to incorporate a routine surveillance, have limited information regarding the effectiveness of the given treatments. Increased travel is a major factor facilitating the spread of *Plasmodium* infections and resistance. However, travellers who return from endemic countries infected with malaria often present with low immunity against the parasites and there is no risk of re-infection. Thus, they could be used as a sentinel population to detect therapeutic failures due to resistance.

We explore in this work the use of a travellers' surveillance system for detecting the emergence of antimalarial drug resistance and monitoring the evolution of resistance in endemic areas. The data come mainly from the National Malaria Reference Center from France, between 2000-2011.

First, we investigate whether data on travellers returning from Africa with malaria could serve as an additional surveillance system for the emergence of drug resistance in endemic-countries. Then, the value of this system is tested through two different applications: the detection of emergence of chloroquine-resistance in Haiti and the evolution of chloroquine-resistance following the changes of treatment policy in Africa.

Our study confirms the valuable source of information coming from travellers' surveillance as an additional system for tracking resistance in endemic countries and facilitating an appropriate response by health policy makers.

Key words: *Plasmodium falciparum*, malaria, travellers, antimalarial drugs, resistance, surveillance system, artemisinin-based combination therapies, molecular markers of resistance, *in vitro* susceptibility

Laboratoire d'accueil

UMR 216- Mère et enfant face aux infections tropicales

Institut de recherche pour le développement

Université Paris Descartes

Faculté de pharmacie-laboratoire de parasitologie

4, avenue de l'observatoire

75270 Paris cedex 6

TABLE DES MATIERES

1	- INTRODUCTION.....	- 12 -
1.1	Généralités.....	- 13 -
1.1.1	Le parasite et son vecteur.....	- 13 -
1.1.2	Manifestations cliniques du paludisme.....	- 15 -
1.1.3	Diagnostic biologique.....	- 17 -
1.1.4	Epidémiologie du paludisme dans le monde.....	- 17 -
1.1.5	Contrôle du paludisme en zone endémique.....	- 20 -
1.2	Épidémiologie de la résistance aux antipaludiques.....	- 22 -
1.2.1	Déterminants de la résistance.....	- 22 -
1.2.2	Modes d'évaluation de la résistance.....	- 25 -
1.2.2.1	L'évaluation par les méthodes in vivo.....	- 26 -
1.2.2.1.1	Evaluation de la résistance.....	- 26 -
1.2.2.1.2	Distinction entre réinfection et recrudescence par génotypage.....	- 29 -
1.2.2.1.3	Dosage sanguin des médicaments.....	- 30 -
1.2.2.2	L'évaluation par les marqueurs moléculaires de résistance.....	- 31 -
1.2.2.2.1	Mécanismes moléculaires de résistance.....	- 31 -
1.2.2.2.2	Avantages et limites des tests moléculaires dans la détection de résistance.....	- 37 -
1.2.2.3	L'évaluation par les tests de susceptibilité in vitro.....	- 38 -
1.2.3	Traitements antipaludiques disponibles et résistance avant l'ère des CTAs.....	- 41 -
1.2.3.1	La quinine.....	- 41 -
1.2.3.2	La chloroquine.....	- 42 -
1.2.3.3	La sulfadoxine+pyriméthamine.....	- 42 -
1.2.3.4	L'amodiaquine.....	- 43 -
1.2.3.5	La méfloquine.....	- 43 -
1.2.3.6	L'atovaquone+proguanil.....	- 44 -
1.2.4	Stratégies thérapeutiques pour les populations à risque.....	- 44 -
1.2.4.1	Stratégies de prévention saisonnière.....	- 45 -
1.2.4.2	Stratégie de prévention chez la femme enceinte.....	- 45 -
1.2.4.3	Stratégie de prévention chez la femme enceinte infectée par le VIH....	- 46 -
1.2.4.4	Stratégies thérapeutiques du voyageur de retour en France de zone d'endémie.....	- 46 -
1.2.5	Evolution vers les stratégies thérapeutiques à base d'artémisinine.....	- 47 -
1.2.5.1	Stratégies thérapeutiques du paludisme non compliqué.....	- 48 -
1.2.5.2	Stratégies thérapeutiques du paludisme compliqué.....	- 51 -
1.2.6	Emergence de la résistance aux CTAs.....	- 53 -
1.2.7	Impact de la résistance en terme de santé publique.....	- 57 -

1.3	La surveillance de l'efficacité des antipaludiques.....	- 58 -
1.3.1	Les systèmes de surveillance de la résistance en zone endémique	- 58 -
1.3.1.1	Quelles recommandations pour une surveillance efficace?	- 58 -
1.3.1.2	Un manque d'information concernant la résistance aux antipaludiques -	58 -
1.3.1.3	La mise en place d'un réseau de surveillance internationale en zone endémique	- 60 -
1.3.2	La surveillance des voyageurs comme solution ?	- 63 -
1.3.2.1	Les réseaux de surveillance des maladies infectieuses chez les voyageurs....	- 63 -
1.3.2.2	Epidémiologie du paludisme d'importation.....	- 64 -
2	- POSITION DU PROBLEME	- 69 -
2.1	Rationnel	- 70 -
2.2	Hypothèse.....	- 71 -
2.3	Objectif.....	- 72 -
3	- POPULATION ET METHODES	- 74 -
3.1	Organisation du système de surveillance national du paludisme d'importation en France	- 75 -
3.2	Données épidémiologiques du paludisme d'importation en France	- 78 -
3.3	Mise en place de collaborations pour un réseau international de la surveillance du paludisme d'importation	- 80 -
3.3.1	Paludisme d'importation au Royaume-Uni.....	- 80 -
3.3.2	Autres partenaires approchés	- 81 -
3.4	Les données rassemblées pour cette étude	- 82 -
3.4.1	Pour les cas importés.....	- 82 -
3.4.2	Pour les données de terrain.....	- 82 -
4	- LA RESISTANCE CHEZ LES VOYAGEURS EST - ELLE REPRESENTATIVE DE CELLE OBSERVÉE SUR LE TERRAIN? (ARTICLE 1)	- 83 -
4.1	Problématique de l'article 1	- 84 -
4.2	Résumé des principaux résultats	- 85 -
5	- LA SURVEILLANCE DES VOYAGEURS COMME OUTIL DE DETECTION DE L'EMERGENCE DE LA RESISTANCE (ARTICLE 2)..	- 120 -
5.1	Problématique de l'article 2	- 121 -
5.2	Résumé des principaux résultats	- 122 -
6	- LA SURVEILLANCE DES VOYAGEURS COMME OUTIL DE SUIVI DE L'EVOLUTION DES PROFILS DE RESISTANCE (ARTICLES 3 ET 4)	- 127 -
6.1	Problématique des articles 3 et 4.....	- 128 -
6.2	Résumé des principaux résultats	- 130 -

7	- DISCUSSION	- 166 -
7.1	Réflexions pour l'amélioration de la surveillance de la résistance à l'échelle internationale	- 170 -
7.2	Quelles stratégies globales de prévention pour contrôler la diffusion et l'émergence de la résistance en zone endémique ?	- 173 -
7.2.1	Plan mondial de confinement de la résistance aux dérivés de l'artémisinine (GPARC)	- 173 -
7.2.2	Agir sur les stratégies thérapeutiques nationales pour retarder l'émergence de résistance	- 176 -
7.2.2.1	Changement dynamique des stratégies thérapeutiques	- 176 -
7.2.2.2	Remplacement des monothérapies par des combinaisons thérapeutiques.	- 178 -
7.2.2.3	Administration simultanée de trois molécules ou plus	- 179 -
7.2.2.4	Administration de traitement de masse	- 179 -
7.2.2.5	Dépistage de masse et traitement	- 180 -
7.2.2.6	Mise en place de premières lignes thérapeutiques multiples dans un pays. ...	- 180 -
7.2.3	Quelles perspectives dans le futur?	- 181 -
8	- CONCLUSION.....	- 182 -
9	- REFERENCES	- 185 -
10	- ANNEXES.....	- 199 -

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
AMFm	Affordable Medicines Facility – malaria
ATP	Adénosine Tri Phosphate
CDCs	Centers for Disease Control and Prevention
CI ₅₀ , CI ₉₀	Concentration d'inhibition 50% et 90%
CNR Palu	Centre National de Référence du Paludisme
CTAs	Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
<i>Glurp</i>	gène codant pour la Glutamine Rich Protein
GPARC	Global plan for artemisinin resistance containment
IC95	Intervalle de confiance 95%
InVS	Institut national de Veille Sanitaire
ISTM	International Society of Travel Medicine
MMV	Medicines and Malaria Venture
<i>msp1</i> , <i>msp2</i>	gènes codant pour la Merozoïte surface Protein 1 et 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
OR	Odd Ratio
<i>P</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PfATP6</i>	gène codant pour <i>P. falciparum</i> sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 6
<i>Pfcr1</i>	gène codant <i>P. falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>Pfdhfr</i>	gène codant <i>P. falciparum</i> dihydrofolate reductase
<i>Pfdhps</i>	gène codant <i>P. falciparum</i> dihydropteroate synthase
<i>Pfmdr1</i>	gène codant pour <i>P. falciparum</i> multidrug resistance 1 protein
<i>PfMRP1</i>	gène codant pour <i>P. falciparum</i> Multidrug Resistance Protein 1
RR	Risque Relatif
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATpease
SP	sulfadoxine+pyriméthamine
TPI	Traitement Préventif Intermittent
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WWARN	WorldWide Antimalarial Resistance Network
WHO	World Health Organization

1 - INTRODUCTION

Le paludisme représente la première endémie parasitaire en zone tropicale. C'est en Afrique sub-saharienne que se concentrent plus de 90% de la morbidité et de la mortalité attribuables à cette affection. Outre la morbi-mortalité de cette pathologie, il existe un impact important sur le développement socio-économique des zones impaludées. Les effets sont directs, dus aux coûts qui touchent familles et pouvoirs publics, mais aussi indirects par la perte de productivité et de revenus. De plus, le nombre limité des traitements antipaludiques actuellement disponibles et la diffusion des résistances à ces traitements placent cette parasitose comme un problème majeur de santé publique.

1.1 Généralités

1.1.1 Le parasite et son vecteur

Hippocrate (V^{ème} siècle av. J.-C.) fut le premier à décrire les fièvres tierces bénignes et les fièvres quartes, à observer leur aspect saisonnier, à noter l'association à une splénomégalie et à faire une relation avec la présence des eaux stagnantes des marais. Le paludisme ou malaria fut longtemps confondu avec des fièvres de toutes origines, en particulier la typhoïde et la fièvre jaune. Ce n'est qu'en 1880, à Constantine, qu'Alphonse Laveran décrivit l'agent responsable du paludisme qu'il dénomma *Oscillarium malariae*. Et en 1897, Ronald Ross, entomologiste britannique, démontra que la transmission du paludisme pouvait être liée à la piqûre d'un moustique.

Le paludisme est une parasitose causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Plus de 100 espèces sont actuellement recensées pouvant infecter les mammifères, les oiseaux ou les reptiles. Il existe classiquement quatre espèces pathogènes chez l'Homme : *P. falciparum*¹, le plus répandu en zones tropicales et intertropicales; *P. vivax*, majoritaire dans les zones subtropicales et tempérées; *P. malariae* et *P. ovale*. Une cinquième espèce, *P. knowlesi*, infectant habituellement les singes macaques, a récemment été décrite chez l'Homme en Asie du Sud-Est [1,2].

¹ Seul le paludisme à *P. falciparum* sera étudié dans la suite de ce travail

INTRODUCTION

Le parasite est transmis du sujet infesté au sujet réceptif par la piqûre d'un moustique femelle adulte vecteur, l'anophèle. La transmission interhumaine par transfusion sanguine ou par transmission congénitale reste une exception. Les différentes espèces d'anophèles ont chacune des aires de distribution bien définies, résultant de leur évolution biogéographique et qui conditionnent la présence du paludisme. Leur écologie et leur compétence vectorielle ont modelé l'épidémiologie de la maladie. En raison de sa bonne adaptation à l'Homme, l'espèce *Anopheles gambiae sl.* est le principal vecteur en Afrique sub-saharienne.

La **Figure 1** illustre le cycle du paludisme chez l'Homme (cycle asexué) et l'anophèle (cycle sexué) [3]. Lors d'un repas sanguin, l'anophèle inocule à l'Homme les sporozoïtes, stade infectieux du parasite, qui gagnent le foie en quelques minutes et s'y multiplient en une à deux semaines. Les hépatocytes parasités éclatent et libèrent les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ceux-ci envahissent les hématies dans lesquelles ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes par multiplication. Ces derniers se libèrent du globule rouge par éclatement, et vont coloniser d'autres hématies qu'ils détruiront à leur tour. Ce n'est qu'après plusieurs cycles de multiplication que les formes sexuées de *Plasmodium* (ou gamétocytes) apparaissent dans les hématies. Le moustique au cours d'un repas sur un hôte infecté se gorge de sang contaminé par les gamétocytes. Dans l'intestin moyen du moustique, les microgamètes fécondent les macrogamètes (stades extra-érythrocytaires sexués) conduisant à des ookinètes zygotiques qui traversent la paroi de l'intestin pour former des oocystes où s'individualisent de nombreux sporozoïtes. Les sporozoïtes migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique, qui reste infectieux pendant 1 à 2 mois. Après maturation, les parasites sont à nouveau injectés à un individu sain à l'occasion de la piqûre de l'insecte.

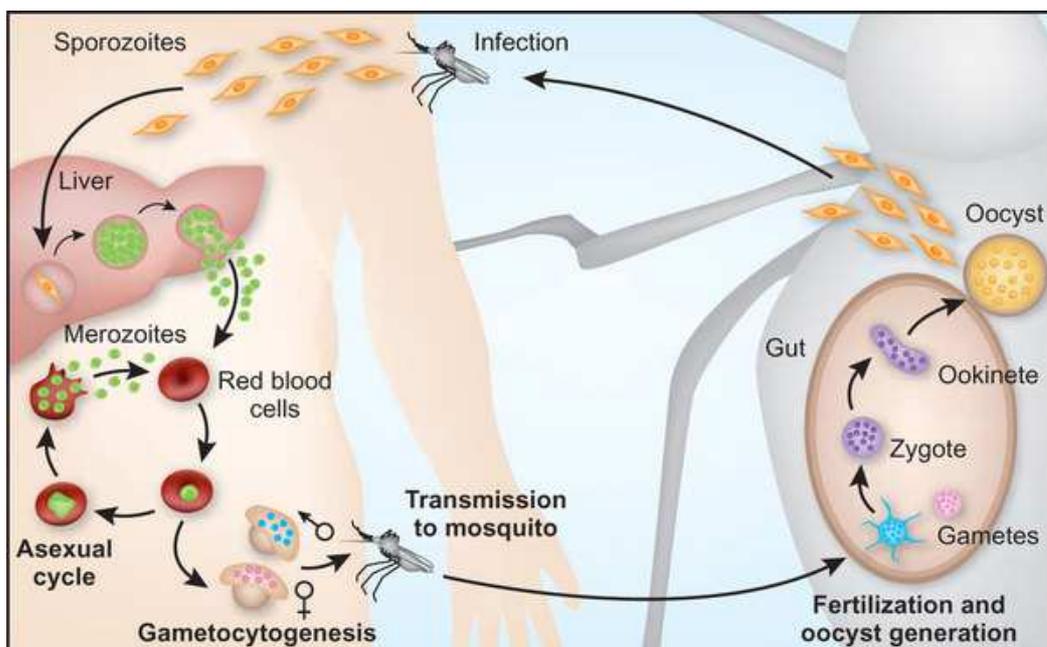


Figure 1: Cycle parasitaire du *plasmodium* (extrait de Pasvol et al., 2010)

1.1.2 Manifestations cliniques du paludisme

Les manifestations cliniques du paludisme sont diverses dans leur expression et leur gravité et dépendent à la fois de l'espèce plasmodiale et de son hôte. Les symptômes de l'accès palustre non compliqué chez l'Homme sont peu spécifiques et similaires pour toutes les espèces (Tableau 1).

En absence de traitement adéquat, les crises se répètent pendant environ une dizaine de jours, tous les 3 jours pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* (fièvre tierce) et tous les 4 jours pour *P. malariae* (fièvre quarte). Les infections par *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* ont généralement une évolution favorable, même si des formes sévères de détresse respiratoire, d'anémie sévère, ou de coma ont récemment été décrites pour *P. vivax* [4,5]. Le développement de formes quiescentes pour ces trois espèces peut entraîner des réviviscences tardives des années après le retour de zone d'endémie. L'infection à *P. falciparum* peut également évoluer vers des formes sévères, responsables très souvent d'atteintes neurologiques (voire coma), d'acidoses métaboliques, d'anémies sévères, d'hypoglycémies, d'œdèmes aigus du poumon ou d'insuffisances rénales aiguës. Les formes sévères sont presque toujours létales en absence de prise en charge thérapeutique efficace et fatales dans 10 à 20% des cas malgré la mise sous traitement efficace [6,7].

INTRODUCTION

	Manifestations cliniques	Durée
Incubation		9 à 30 jours pour <i>P. falciparum</i> 18 à 40 jours pour <i>P. malariae</i> 15 jours à plusieurs mois pour <i>P. vivax et P. ovale</i> 9 à 12 jours pour <i>P. knowlesi</i>
Accès palustre		
Période froide	Début brutal : Frissons, chair de poule	15 mn à une heure
Période chaude	Fièvre, maux de tête, soif, vomissement	2 heures ou plus
Période de repos	Sueurs profuses, grande lassitude	6 à 10 heures

Tableau 1: Manifestations cliniques de l'accès palustre (adapté de Mc Gregor et al., 1988)

La variété des manifestations cliniques dépend du niveau d'immunité des patients infectés, lui-même fortement corrélé à la transmission. La transmission du paludisme peut exister sur un mode endémique ou sur un mode épidémique pouvant influencer l'ampleur et la nature de l'infection.

Dans des zones de transmission élevée et modérée (stable) du paludisme, deux grands groupes sont à risque de déclarer la maladie :

- les enfants dont l'immunité naturelle contre le paludisme n'est pas encore acquise et qui ne s'installera qu'après un nombre conséquent d'infections (contrairement aux nouveau-nés qui profitent des anticorps maternels pour assurer leur protection) ;
- les femmes enceintes dont l'immunité est fortement diminuée par la grossesse causant 10 000 décès maternels par an, de 8 à 14 % des cas de faible poids de naissance et de 3% à 8 % des décès de nourrissons [8,9].

Dans des zones de transmission épidémique ou faible (instable), cette immunité est beaucoup moins développée, ayant comme conséquence, une morbidité importante sur l'ensemble des classes d'âge, en particulier lors des épidémies qui surviennent à la suite d'évènements climatiques, de changement de l'environnement ou simplement après la cessation des mesures de lutte [10]. L'immunité acquise est de prémunition car elle n'est pas durable dans le temps.

En cas d'interruption de l'exposition, celle-ci tend à diminuer rapidement, expliquant en partie la difficulté pour les enfants et les adultes d'acquérir une immunité protectrice dans les régions à faible transmission [11].

1.1.3 Diagnostic biologique

Un diagnostic fiable de paludisme inclut un examen clinique ainsi qu'un examen parasitologique des prélèvements sanguins du patient. Il permet d'identifier la présence de *Plasmodium*, et si possible de quantifier et caractériser les espèces responsables. La méthode de référence du diagnostic parasitologique est l'observation des formes asexuées de *Plasmodium* par l'examen d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse de sang au microscope optique. Le frottis permet d'identifier les espèces selon leurs caractéristiques tandis que la goutte épaisse augmente la sensibilité de l'examen. En absence de microscope et de personnel médical formé au diagnostic microscopique du paludisme, particulièrement en zone endémique, les tests de détection rapide d'antigènes (TDR : tests de diagnostic rapide), plus faciles d'utilisation, sont utilisés.

1.1.4 Épidémiologie du paludisme dans le monde

La répartition du paludisme s'étend sur l'ensemble de la zone intertropicale. De forts niveaux d'endémicité sont présents en Afrique (essentiellement en Afrique sub-saharienne et à moindre échelle en Afrique du Sud). De faibles niveaux d'endémicité sont trouvés en Amérique Centrale et du Sud mais également en Asie Centrale et du Sud-Est, où seules des poches de transmission intermédiaire et plus rarement de forte transmission persistent [12]. Cette distribution pourrait inclure dans le futur des régions actuellement exemptes de paludisme, en raison des changements climatiques et du réchauffement graduel des zones tempérées [13].

Malgré les tentatives d'éradication par les campagnes de lutte anti-vectorielle, impulsées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) entre les années 1950 et 1960, le paludisme reste un problème majeur de santé publique à l'échelle internationale. Sur 104 pays situés en zone endémique, 79 pays sont classés en phase de contrôle du paludisme, 10 sont en phase de pré-élimination, 10 sont en phase d'élimination et 5 sont dans la phase de prévention contre la réintroduction du paludisme. Il s'agit de l'infection parasitaire la plus fréquente dans le

INTRODUCTION

monde avec un nombre d'épisodes cliniques par an estimé par l'OMS à 233 millions en 2000, à 244 millions en 2005 et retombé à 219 millions (Intervalle de confiance 95% [IC95], 154 - 289) en 2010. La majorité des cas sont diagnostiqués en Afrique sub-saharienne (80%) puis en Asie du Sud-Est (13%) [14]. Pourtant, sous les tropiques et particulièrement en Afrique, le diagnostic parasitaire reste limité et la déclaration par les services administratifs absente, ce qui rend les statistiques officielles de l'OMS souvent sous-estimées. Certains auteurs ont donc préféré estimer ce chiffre à 451 millions (IC95, 349 - 552) en 2007, après des méthodes complexes de modélisation géostatistique [15] (**Figure 2**).

Le nombre de décès est, quant à lui, estimé à 660 000 (IC95, 610 000 - 971 000) par l'OMS en 2010, touchant principalement les enfants de moins de cinq ans (86%) et les personnes vivant en Afrique sub-saharienne (91%) [15]. Là encore, ce chiffre serait sous-estimé selon certains auteurs, pour qui, le nombre de décès attribuables au paludisme en 2010 atteindrait 1,170 millions (IC95%, 0,917 – 1,527) [16].

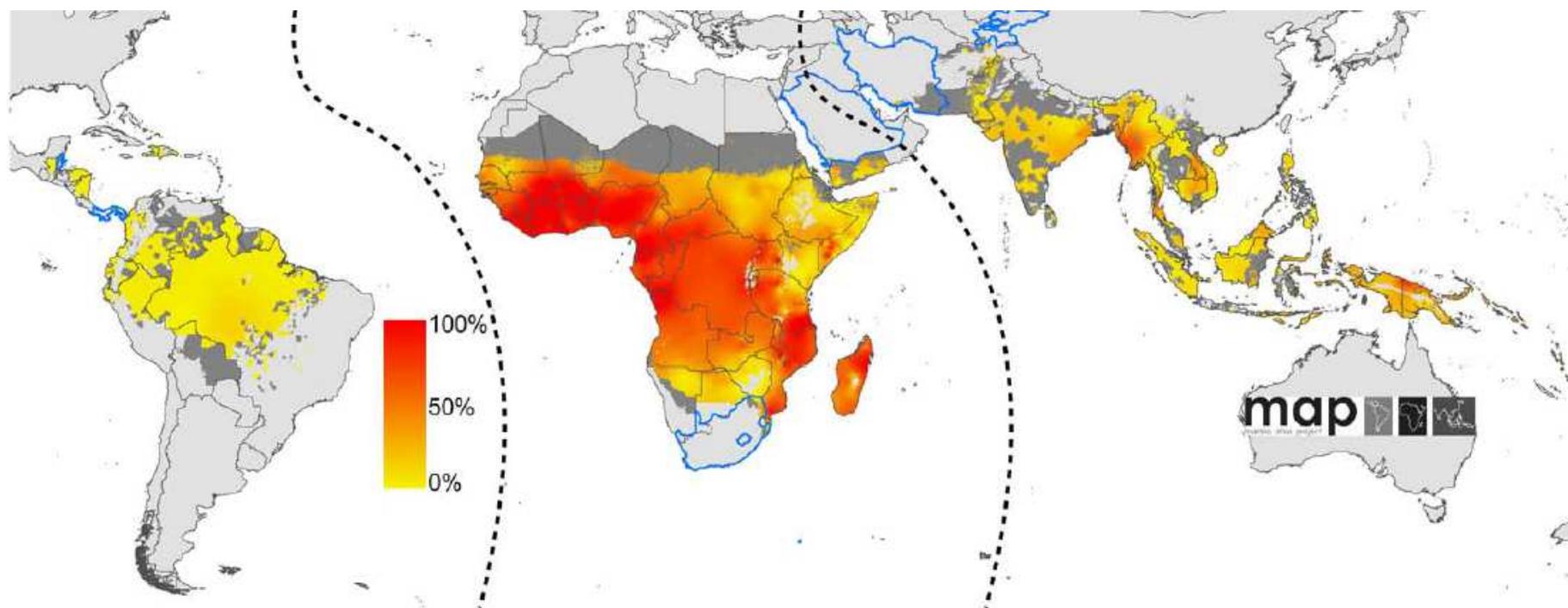


Figure 2: Estimation de la distribution spatiale de l'endémicité de *P. falciparum* en 2007 (extrait de Hay et al., 2010). Les données s'appuient un modèle géostatistique. La transmission du paludisme est représentée en continue du jaune au rouge (de 0% - 100%), respectivement d'une faible à une forte endémicité. Les zones restantes sont définies comme risque instable (gris foncé) ou absence de risque (gris clair). Les traits pointillés séparent la région Amérique, de la région Afrique et de la région Asie centrale et Sud-Est. Les 7 pays ayant la frontière marquée en bleu, présentent une faible endémicité et des systèmes nationaux de surveillance sanitaire et d'information fiables – Malaria Atlas Project.

1.1.5 Contrôle du paludisme en zone endémique

Des politiques de lutte antipaludique sont très présentes dans les pays endémiques et participent à la promotion d'un meilleur « contrôle » de cette pathologie, voire à une éradication dans certaines zones impaludées. En 1998, l'Initiative Roll Back Malaria (RBM, faire reculer le paludisme) fut impulsée conjointement par l'OMS, la Banque Mondiale, les Fonds des Nations-Unies pour l'Enfance (UNICEF), et les Programmes des Nations-Unies pour le Développement (PNUD). Le but était de diminuer de moitié la charge mondiale liée au paludisme sur la période 2000-2010, en proposant une réponse globale au paludisme.

Les stratégies de contrôle du paludisme couvrent deux aspects importants : la prévention et la gestion des cas de paludisme. Ces deux approches combinées permettent de diminuer la transmission du parasite, de réduire l'incidence des cas et de prévenir l'évolution de formes simples vers des formes compliquées.

Actuellement, les politiques de santé focalisent leurs actions sur cinq niveaux principaux de contrôle (**Figure 3**) [14]:

- la lutte antivectorielle ;
- le contrôle de la résistance aux insecticides ;
- les traitements préventifs chez les populations vulnérables ou administrées de façon saisonnière ;
- le dépistage et le traitement adéquat des cas ;
- le contrôle et la surveillance de la résistance aux antipaludiques.

La résistance aux antipaludiques est un des facteurs principaux qui entrave le contrôle efficace du paludisme à l'échelle mondiale. Une surveillance continue de l'efficacité des antipaludiques est indispensable pour informer les politiques de traitement et assurer une détection précoce des modifications des profils de résistance.

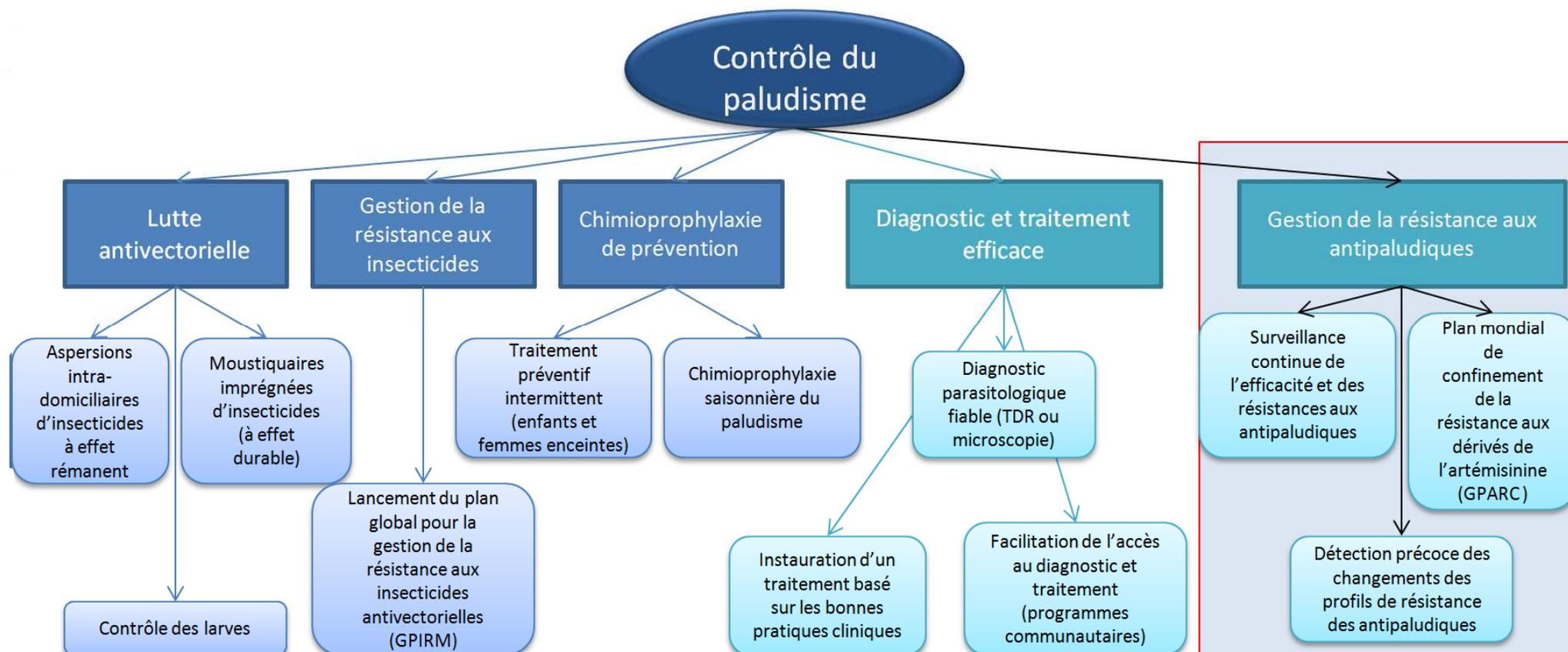


Figure 3: Les stratégies de contrôle du paludisme en zone endémique (adapté du rapport de l’OMS, 2012).

L’encadré rouge souligne la partie qui sera plus spécifiquement abordée dans le reste du manuscrit.

1.2 Épidémiologie de la résistance aux antipaludiques

1.2.1 Déterminants de la résistance

La résistance aux antipaludiques se définit comme étant la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un traitement donné à une dose égale ou supérieure à celle usuellement recommandée, et dans les limites de tolérance du sujet. De nombreux facteurs influencent cette résistance (**Figure 4**) [17,18].

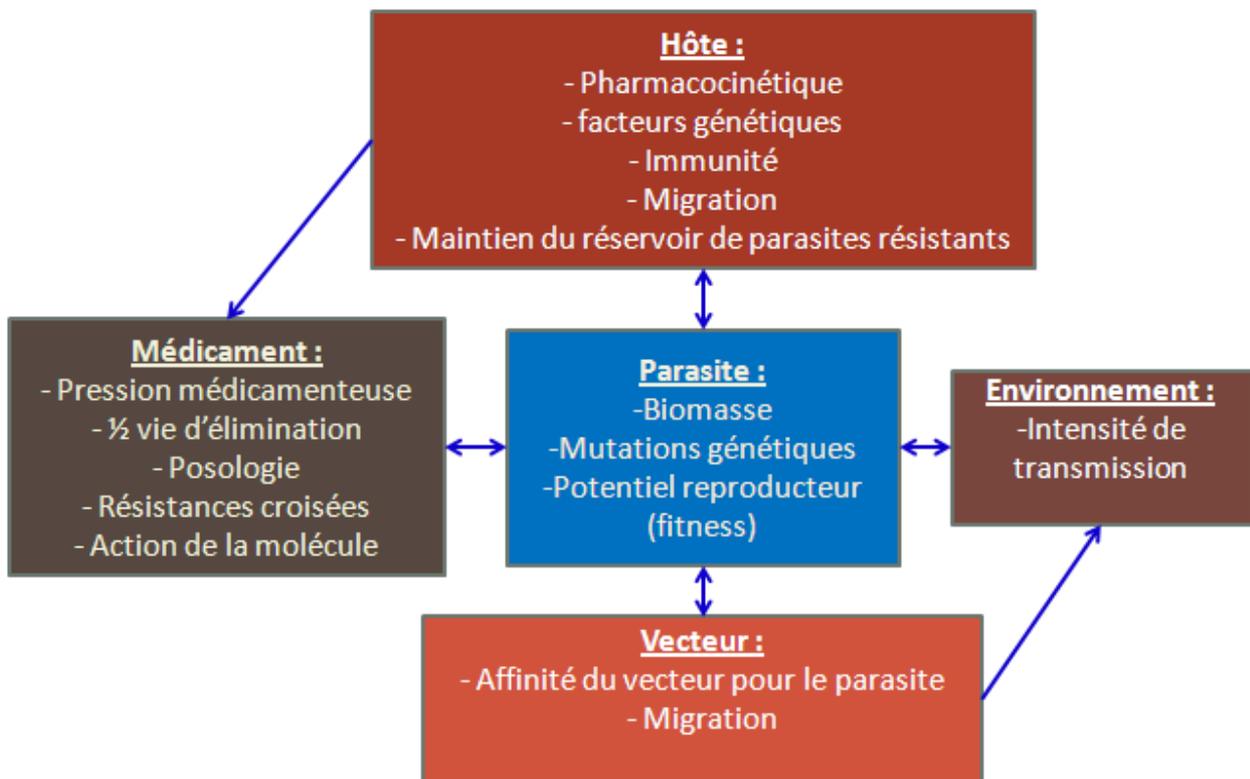


Figure 4: Déterminants de la résistance aux antipaludiques (adapté de Wongsrichanalai et al., 2002)

Deux évènements distincts sont nécessaires à l'émergence de la résistance : des mutations génomiques *de novo* et une pression de sélection des médicaments.

Les parasites, comme les virus, possèdent une grande variabilité génétique qui est source d'échappement immunitaire et de chimiorésistance. Pourtant, la fréquence des mutations dans

INTRODUCTION

une population de parasites peu exposée à la molécule est très faible (probabilité de mutation par nucléotide par réplication de l'ADN : 10^{-8}).

Ainsi les mutations sont rares ; une ou plusieurs mutations peuvent être requises pour réduire la sensibilité à la molécule ; les parasites mutants ont une faible viabilité et leur potentiel reproducteur (fitness) est diminué [19]. Dans ces conditions, la pression médicamenteuse joue un rôle déterminant dans la sélection et le maintien des parasites résistants dans une population naturelle. L'utilisation d'antipaludiques en absence d'un diagnostic de confirmation biologique conduit à l'utilisation de traitement présomptif favorisant la pression médicamenteuse non ciblée. Les propriétés antipyrétiques de certains antipaludiques, tels que la chloroquine, favorisent également leur utilisation dans des indications autres que le paludisme.

Pour certaines molécules, la présence de résistances croisées est également un facteur déterminant du développement des résistances. C'est le cas de l'association sulfadoxine+pyriméthamine (SP) avec la sulfaméthoxazole+triméthoprim, et de la chloroquine avec l'amodiaquine [20,21].

Les parasites qui survivent au traitement seront très probablement éliminés par la réponse immunitaire. Cependant, l'infection peut subsister si l'immunité de l'hôte est faible ou altérée (chez l'enfant et la femme enceinte, par exemple) ou si la fraction des parasites survivants reste trop élevée.

Deux phénomènes sont en cause :

- Le phénomène de recrudescence, qui correspond à la sélection d'une population de parasites mutants ayant survécu au traitement d'une première infection. Il est causé, soit par une diminution de la sensibilité des parasites à la molécule, soit par la présence de concentrations sanguines sub-thérapeutiques (particulièrement dans le cas des molécules à longue demi-vie, des médicaments de mauvaise qualité, d'une faible adhérence au traitement ou d'une biodisponibilité réduite liée à une mauvaise absorption) [22,23];
- Le phénomène de réinfection correspond, quant à lui, à une nouvelle infection apparaissant peu après l'initiation d'un traitement. La plupart des antipaludiques sont peu ou pas actifs sur les formes pré-érythrocytaires du parasite mais uniquement sur les formes érythrocytaires émergeant des hépatocytes. En cas de réinfection, les concentrations

INTRODUCTION

d'antipaludiques qui sont après quelques jours sous les seuils curatifs, ne freinent plus la croissance des parasites provenant du foie. La sélection des parasites moins sensibles et le développement des résistances sont favorisés.

Dans les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs), par exemple, les dérivés de l'artémisinine réduisent rapidement la biomasse parasitaire et ne laissent à la molécule partenaire que relativement peu de parasites à éliminer. La molécule associée agit donc sur les parasites résiduels, à des concentrations plus élevées que si elle avait été administrée en monothérapie, éliminant ainsi les parasites pouvant lui être potentiellement résistants (**Figure 5**). En supprimant l'ensemble des parasites résiduels, elle joue également un rôle protecteur vis-à-vis de l'émergence de résistances aux dérivés de l'artémisinine [24].

Le niveau de transmission de la région endémique joue, quant à lui, un rôle controversé. Certains auteurs considèrent que la prévalence de la résistance est plus élevée dans les régions à faible transmission alors que certains modèles suggèrent que le contrôle de la transmission du paludisme retarderait le développement de la résistance [25,26].

Enfin dans certains cas, l'affinité du vecteur au parasite permet d'augmenter l'infectiosité et la productivité des parasites résistants. Par exemple, les parasites chloroquino-résistants auraient un potentiel reproducteur accru au sein d'*Anopheles dirus*, entraînant la propagation de la résistance à la chloroquine en Asie du Sud-Est et en Océanie de l'Ouest [27].

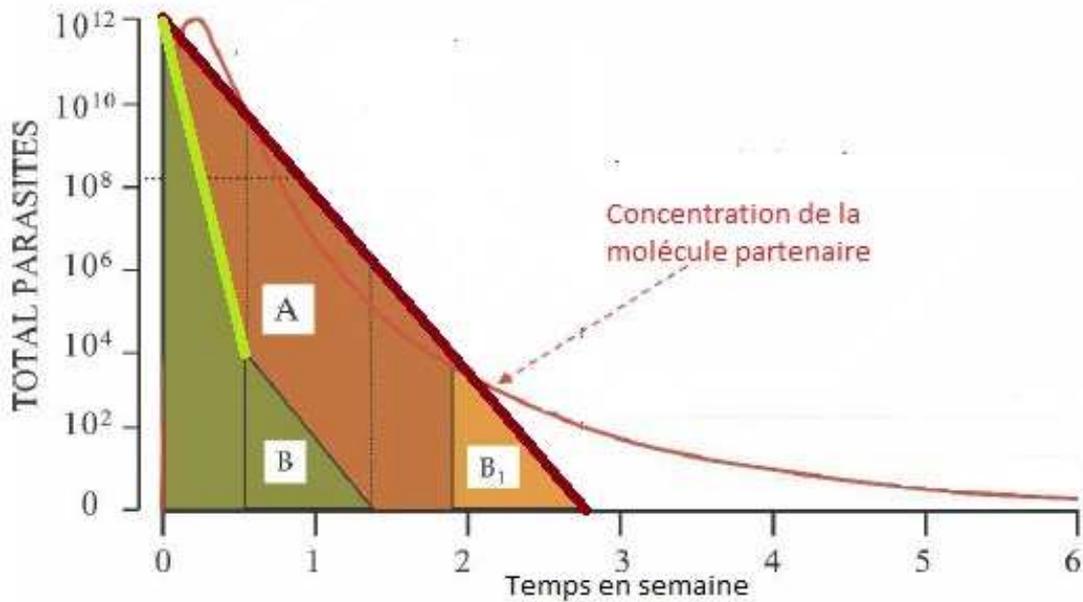


Figure 5: Pharmacocinétique et dynamique des CTAs chez *P. falciparum* (adapté de White, 1999). L'aire A représente la biomasse des parasites dans le sang lors d'une exposition à une molécule partenaire en monothérapie, ici la méfloquine. Alors que l'aire colorée verte représente la biomasse des parasites lors d'une exposition à une CTA pendant 3 jours. Dans les CTAs, les dérivés de l'artémisinine réduisent rapidement la biomasse parasitaire (ligne verte) et seulement un faible nombre de parasites résiduels (triangle B) est exposé à la méfloquine. Les parasites résiduels se retrouvent face à des concentrations plus élevées de méfloquine (ligne rouge) que la même biomasse parasitaire (triangle B1) exposée à la méfloquine en monothérapie.

1.2.2 Modes d'évaluation de la résistance

La surveillance de la résistance est une composante essentielle dans le cadre d'un programme national de lutte contre le paludisme. *P. falciparum* est capable de s'adapter en permanence et de développer des résistances à l'ensemble des antipaludiques mis sur le marché, y compris les CTAs. Il s'avère donc indispensable de surveiller régulièrement l'efficacité des antipaludiques afin d'adapter en temps voulu les régimes thérapeutiques [28,29,30].

On distingue trois principaux tests pour évaluer l'efficacité et la résistance des antipaludiques :

- L'évaluation *in vivo* de l'efficacité thérapeutique [31];
- l'étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques;
- l'étude *in vitro* par mise en culture pour évaluer la susceptibilité du parasite aux diverses molécules [32].

Deux tests complémentaires sont très souvent utilisés, permettant de valider l'échec thérapeutique réellement lié à la résistance :

- Le génotypage moléculaire pour distinguer la réinfection de la recrudescence [33];
- Le dosage sanguin des médicaments pour s'assurer de l'absence de concentrations sub-thérapeutiques.

1.2.2.1 L'évaluation par les méthodes in vivo

1.2.2.1.1 Evaluation de la résistance

Le test *in vivo* standardisé reste la méthode de référence recommandée par l'OMS. Ce test est basé sur l'observation de la réponse parasitaire chez un patient traité par une dose fixe de médicament, en tenant compte des limites de tolérance. Il permet une appréciation globale de la résistance au traitement malgré les interférences liées au système immunitaire ou à la pharmacodynamie de la molécule.

Plus précisément, ce test consiste à administrer une dose standard de l'antipaludique étudié à une sélection de patients infectés par *P. falciparum*. La disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie puis l'absence de leur réapparition sont suivies et évaluées sur une période d'au moins 28 jours [34].

Les avantages majeurs de cette méthode sont qu'elle évalue la réponse clinique de façon pragmatique, en situation réelle et qu'elle ne nécessite pas d'équipements complexes pour l'évaluation de l'échec thérapeutique. En revanche, elle ne mesure pas la présence d'évènements intercurrents tels que l'immunité, la présence de réinfection ou la présence de concentrations sub-thérapeutiques, qui participent à biaiser l'identification du phénomène de résistance, ou des phénomènes de recrudescence survenant tardivement après 28j par exemple.

Plusieurs protocoles standardisés pour la surveillance de l'efficacité des antipaludiques se sont succédés depuis les années 60s. Le premier protocole, formulé par le groupe scientifique de

INTRODUCTION

l'OMS en 1964 et mis à jour en 1972, distinguait trois niveaux pour la résistance i.e., RI, RII et RIII et un niveau pour la sensibilité S [35,36] (**Tableau 2**). En 1996, le protocole a été modifié pour mettre l'accent sur l'échec thérapeutique, impliquant un suivi clinique, parasitologique, une mesure de l'hématocrite et de la température à 14 jours. Une réponse clinique adéquate se distinguait d'un échec thérapeutique précoce ou tardif [37] (**Tableau 3**). En 2003 puis en 2009, le protocole a été à nouveau remplacé afin de distinguer l'échec parasitologique de l'échec clinique. Cette distinction a toute son importance pour le dépistage et la prise en charge des patients asymptomatiques en échec parasitologique [7,38] (**Tableau 4**). En effet, la présence de parasites résiduels favorise le développement d'un paludisme sévère et augmente la morbi-mortalité associée à l'échec thérapeutique ; tandis que le portage de gamétocytes favorise la transmission de l'infection et de la résistance.

Classification OMS (OMS, 1973)	Définition
S (Sensible)	Diminution <25% de la parasitémie initiale à J2 avec des frottis négatifs de J7 à J28.
RI (niveau de résistance I)	Diminution de la parasitémie en dessous du seuil de détection microscopique pendant au moins 2 jours durant les 7 premiers jours suivant le début du traitement, une recrudescence étant observée entre J8 et J28.
RII (niveau de résistance II)	Elimination initiale ou diminution substantielle de la parasitémie (<25% du compte initial à J2) mais persistance ou recrudescence de la parasitémie entre J4 et J7.
RIII (niveau de résistance III)	Pas de diminution significative de la parasitémie.

Tableau 2: Classification de la sensibilité des antipaludiques lors du test *in vivo*, protocole OMS 1973

INTRODUCTION

Classification OMS modifiée (OMS, 1996)	Définition
ETP (échec thérapeutique précoce)	Apparition de signes de danger ou de paludisme grave aux jours 1, 2 ou 3, en présence d'une parasitémie ; Parasitémie au jour 2 supérieure à celle du jour 0, quelle que soit la température axillaire ; Parasitémie au jour 3 et température axillaire ≥ 37.5 °C; Parasitémie au jour 3 $\geq 25\%$ par rapport à celle du jour 0.
ECT (échec clinique tardif)	Réapparition de symptômes cliniques en présence d'une parasitémie détectable entre J4 et J14.
RCA (réponse clinique adéquate)	Absence d'une parasitémie détectable à J14, indépendamment de la fièvre, ou absence de symptômes cliniques indépendamment de la parasitémie, chez les patients n'ayant pas été classés en ETP ou ECT.

Tableau 3: Classification de la sensibilité des antipaludiques lors du test *in vivo*, protocole modifié OMS 1996

Classification OMS modifiée (OMS, 2009)	Définition
ETP (échec thérapeutique précoce)	Idem classification OMS 1996.
ECT (échec clinique tardif)	Réapparition de symptômes cliniques en présence d'une parasitémie détectable entre J4 et J28 pour les molécules à demi-vie inférieure à 7 jours (amodiaquine, les artémisinines, atovaquone+proguanil, chloroquine, luméfántrine, quinine, SP, etc.) et entre J4 et J42 pour les molécules à longue demi-vie (méfloquine, pipéraquline, etc.) [39].
EPT (échec parasitologique tardif)	Présence d'une parasitémie détectable entre J4 et J28 ou J4 et J42 (selon la demi-vie de la molécule), indépendamment des signes cliniques.
RCPA (réponse clinique et parasitologique adéquate)	Absence d'une parasitémie détectable et/ou de symptômes cliniques à J28 ou J42 selon la molécule, chez les patients n'ayant pas été classés en ETP, ECT ou EPT.

Tableau 4: Classification de la sensibilité des antipaludiques lors du test *in vivo*, protocole modifié OMS 2009

Les études d'efficacité thérapeutique conduites sous l'égide des standards de l'OMS aident les programmes nationaux de contrôle du paludisme à maintenir des politiques nationales de stratégie thérapeutique efficaces et adaptées. Les résultats des tests *in vivo* sont même, à l'heure actuelle, les seuls critères utilisés pour modifier une première ligne de traitement. Or, les tests complémentaires, moléculaires ou *in vitro*, ont montré toute leur importance dans la confirmation et le suivi de la résistance [34].

En raison des divergences des critères d'inclusion, de la qualité du suivi ou de l'interprétation des résultats, les études d'efficacité thérapeutique étaient jusqu'ici difficilement comparables entre elles, malgré un effort de standardisation des protocoles *in vivo*.

Le suivi de la résistance dans le temps et dans l'espace, et la standardisation des méthodes à l'échelle internationale, restent donc un exercice compliqué ; qui a pu être facilité par la création du réseau WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) à partir de 2008.

1.2.2.1.2 Distinction entre réinfection et recrudescence par génotypage

L'évaluation *in vivo* de l'efficacité des antipaludiques nécessite des méthodes complémentaires de génotypage par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour distinguer la réinfection de la recrudescence.

Il est apparu nécessaire de corriger et d'ajuster les estimations de la fréquence des réponses cliniques et parasitologiques adéquates pour tenir compte du biais introduit par les réinfections, qui sont fréquentes en zone de forte transmission. Ces tests sont particulièrement recommandés dans les échecs tardifs pour éviter de faussement diagnostiquer l'existence d'une résistance [7,33,40].

Seule la parfaite similitude génétique des souches montre que les mêmes parasites ont été inoculés par le même vecteur. La probabilité que deux vecteurs soient infectés par exactement les mêmes souches de *P. falciparum* est quasi nulle en zone d'endémie et reste faible au cours d'épidémies de paludisme [41]. A l'aide du génotypage des marqueurs moléculaires *msp1*, *msp2* et *glurp* (gènes codant pour les Merozoïte Surface Protein 1&2 et pour la GLUTamate-Rich Protein), les phénomènes de recrudescence et de réinfection sont différenciés [42]. Ces gènes présentent une diversité allélique élevée en raison d'un polymorphisme de taille importante, permettant la distinction aisée de ces différents allèles. Après l'évaluation du pouvoir discriminant des trois principaux marqueurs, *msp2* et *glurp* ont été considérés comme les plus discriminants [33].

1.2.2.1.3 Dosage sanguin des médicaments

L'évaluation *in vivo* de l'efficacité des antipaludiques nécessite des méthodes complémentaires de dosage des médicaments pour détecter la présence de concentrations sub-thérapeutiques. Les études de pharmacocinétique caractérisent les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination du médicament. Elles sont indispensables et complémentaires des autres tests pour l'identification d'un échec thérapeutique réellement causé par le développement d'une résistance.

Des méthodes simples de dosage, adaptées au terrain et ne nécessitant qu'un petit volume de sang capillaire séché sur un filtre, sont en développement. La disponibilité de ces méthodes associée à des financements suffisants, permettraient aux programmes nationaux de lutte contre le paludisme, et à d'autres organisations conduisant des essais cliniques, d'intégrer les études pharmacologiques en surveillance de routine de l'efficacité thérapeutique.

La connaissance approfondie de la pharmacologie d'un traitement permet l'adaptation des posologies aux différentes classes d'une population. Ainsi, la présence de concentrations sub-thérapeutiques favorisant l'émergence de résistances est évitée. Les modèles de pharmacocinétique des populations peuvent être réalisés avec un nombre limité d'échantillons sanguins. Ils déterminent la pharmacocinétique du médicament et les caractéristiques des individus donnant lieu à une variation inter-individuelle (population-based method of analysis) [43].

Pourtant, l'interprétation des résultats est complexe. Il a été montré que les concentrations sanguines de médicament sont généralement plus faibles chez les enfants que chez les adultes ; et plus faibles chez les patients en échec thérapeutique que chez les patients guéris [44,45,46]. Ces résultats reflètent, soit des concentrations inadéquates, soit une résistance partielle due à la survie des souches moins sensibles chez les patients ayant des concentrations plasmatiques réduites, soit une accumulation du médicament dans les hématies parasitées. Dans ce dernier cas, la concentration plasmatique mesurée diminue lorsque la charge parasitaire augmente.

La circulation de médicaments de mauvaise qualité (produits falsifiés ou produits sous-standards), en zone endémique participe également à la présence de concentrations sanguines de médicament inadéquates dans les populations. La majorité des pays endémiques ont

développé une politique nationale du médicament applicable aux antipaludiques. Les traitements de première et deuxième intention sont définis au niveau national. Les stocks sont ensuite placés dans les centres de santé ou les organismes de santé communautaires. A côté des filières officielles du secteur public et des pharmacies du secteur privé, de nombreux médicaments de mauvaise qualité (sous-dosage, absence de principe actif, etc.) sont mis en circulation au sein des marchés parallèles. Les structures nationales de contrôle des médicaments sont souvent peu opérationnelles. Ces filières parallèles court-circuitent les centres de santé, souvent en rupture de stock, principalement en Afrique et en Asie du Sud-Est. Un décalage apparaît souvent entre les médicaments recommandés par les structures sanitaires et les produits effectivement disponibles au niveau du pays [47,48,49].

1.2.2.2 L'évaluation par les marqueurs moléculaires de résistance

Après les tests *in vivo* d'efficacité thérapeutique, la caractérisation des marqueurs moléculaires associés à la résistance est une composante essentielle dans la bonne compréhension des résistances aux antipaludiques. Les techniques de biologie moléculaire permettent l'identification des modifications génétiques associées à la résistance dans le génome du parasite pour mesurer la chimiorésistance sur le terrain [50].

1.2.2.2.1 Mécanismes moléculaires de résistance

Différents mécanismes de résistance à une molécule ont été identifiés [51]:

- diminution de l'affinité de la molécule à sa cible ;
- altération de son transport ;
- inactivation enzymatique ;
- diminution de la transformation de la molécule en son métabolite actif ;
- augmentation du taux d'un métabolite antagoniste de la molécule ;
- diminution de la quantité des cibles.

Un nombre limité de gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques de *P. falciparum* ont été identifiés.

- ***Pfdhfr et Pfdhps***

Les antifoliques (sulfadoxine, dapsonne) sont des inhibiteurs de la DiHydroPteroate Synthétase (DHPS), alors que les antifoliniques (pyriméthamine, cycloguanil) sont des inhibiteurs de la

INTRODUCTION

DiHydroFolate Reductase (DHFR). Les deux groupes agissent dans le cytosol en bloquant la synthèse d'acides nucléiques (**Figure 6**). La résistance à la SP est un des mécanismes les mieux décrits. Les mutations ponctuelles des gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, codant respectivement pour la DHFR et la DHPS, diminuent l'affinité de la molécule à sa cible.

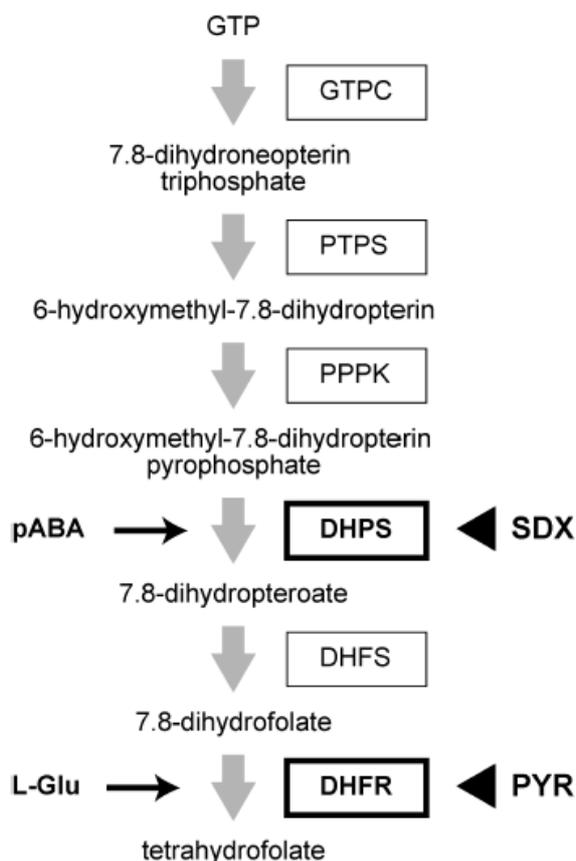


Figure 6: Mécanisme d'action de la sulfadoxine (SDX) et de la pyriméthamine (PYR) sur la biosynthèse du folate par *P. falciparum* (extrait de Mita et Tanabe, 2012)

GTPC : Guanosine Tri Phosphate Cyclohydrolase I ; *PTPS* : PyruvoylTetrahydroPterin Synthase ; *PPPK* : hydroxymethyldihydroPterin PyrophosPhoKinase ; *DHPS* : DiHydroPteroate Synthase ; *DHFS* : DiHydroFolate Synthase ; *DHFR* : DiHydoFolate Reductase ; *pABA* : paraAminoBenzoic Acid

Le séquençage du gène *Pfdhfr* dans des isolats présentant différentes susceptibilités à la pyriméthamine a permis l'identification des mutations suivantes : S108N, N51I, C59R et I164L [52,53,54,55].

Le séquençage du gène *Pfdhps* dans des isolats présentant différentes susceptibilités à la sulfadoxine a permis l'identification des mutations suivantes : S436A/F, A437G, A581G et

A613S [55,56,57]. La mutation K540E ne fut détectée que plus tard lors d'études de terrain [58].

Les échecs thérapeutiques à la SP ont pu être corrélés *in vivo* à la présence combinée des mutations *Pfdhfr* et *Pfdhps*, et plus particulièrement sur le continent africain, au quintuple mutant (*Pfdhfr* : S108N, N51I, C59R + *Pfdhps* : A437G, K540E) [59,60,61]. Le risque d'un échec thérapeutique à cette association serait multiplié par près de 20 en présence d'un quintuple mutant, par près de 10 pour un triple mutant *Pfdhfr* et par près de 5 pour un double mutant *Pfdhps* [61].

- ***Pfcr***

Les amino-4-quinoléines incluant la chloroquine et l'amodiaquine ainsi que les amino-alcools incluant la quinine, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine agissent au niveau de la vacuole digestive en se fixant à l'hématine pour former un complexe toxique et inhiber sa détoxification sous forme d'hémozoïne.

La résistance à la chloroquine a été très bien décrite et implique des mutations du gène *Pfcr* codant pour le transporteur : Chloroquine Resistance Transporter, ayant pour conséquence l'altération du transport de la molécule.

La mutation ponctuelle K76T a été montrée comme étant le principal déterminant de la résistance à la chloroquine [50,62,63]. En effet, les isolats mutants pour *Pfcr* présentent une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive, réversible sous l'action de modulateurs de pompes membranaires comme le vérapamil [64,65] (**Figure 7**). Les mutations restent rares et l'implantation des allèles résistants dans une population est favorisée par la pression médicamenteuse. La fréquence de l'allèle de résistance *Pfcr76T* augmente jusqu'à se fixer dans la population de parasite. Ce processus se dénomme « selective sweep » ou balayage sélectif [66]. Les microsatellites, entourant le gène de résistance *Pfcr76* dans une séquence d'un chromosome de *P. falciparum* et fortement liés à celui-ci, vont être également sélectionnés et perdre de leur diversité. Le polymorphisme des microsatellites peut donc être utilisé comme marqueur moléculaire pour définir l'origine de la résistance (**Figure 8**).

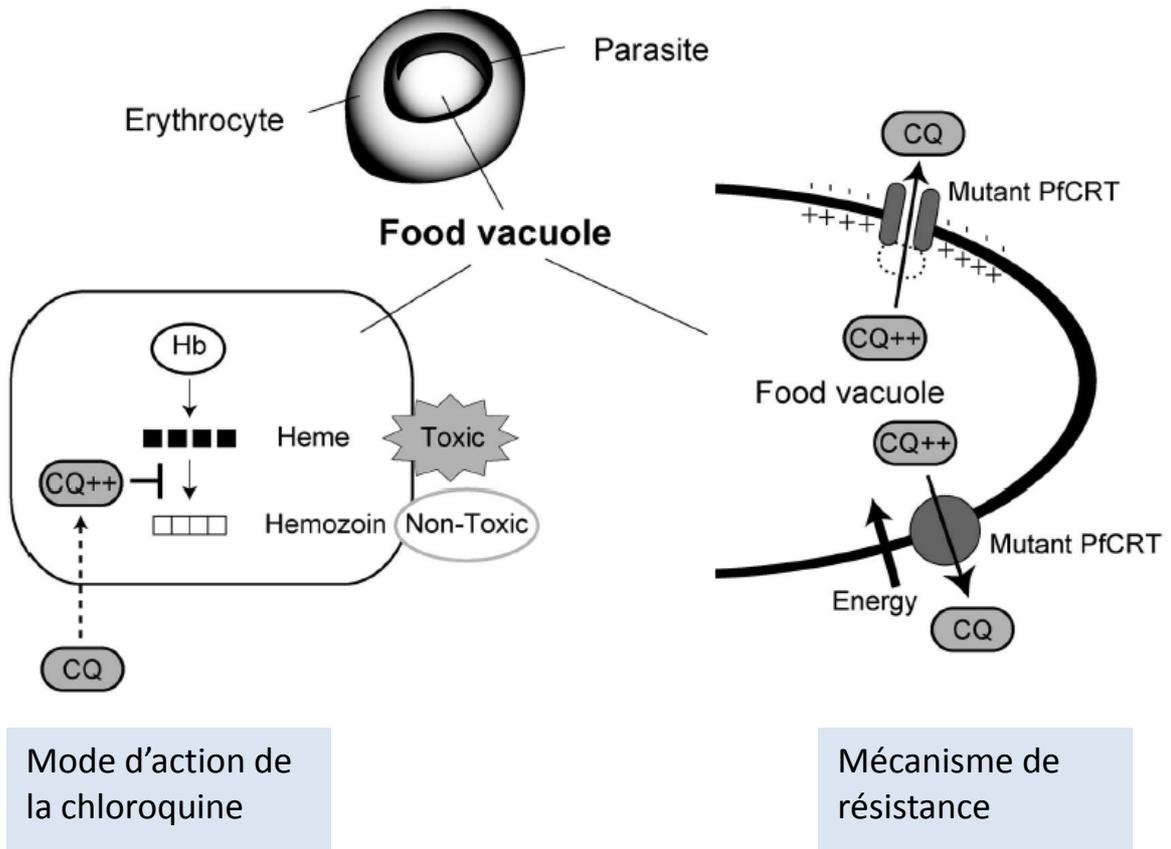


Figure 7: Mécanisme de résistance de à la chloroquine de *P. falciparum* (adapté de Mita et Tanabe, 2012)

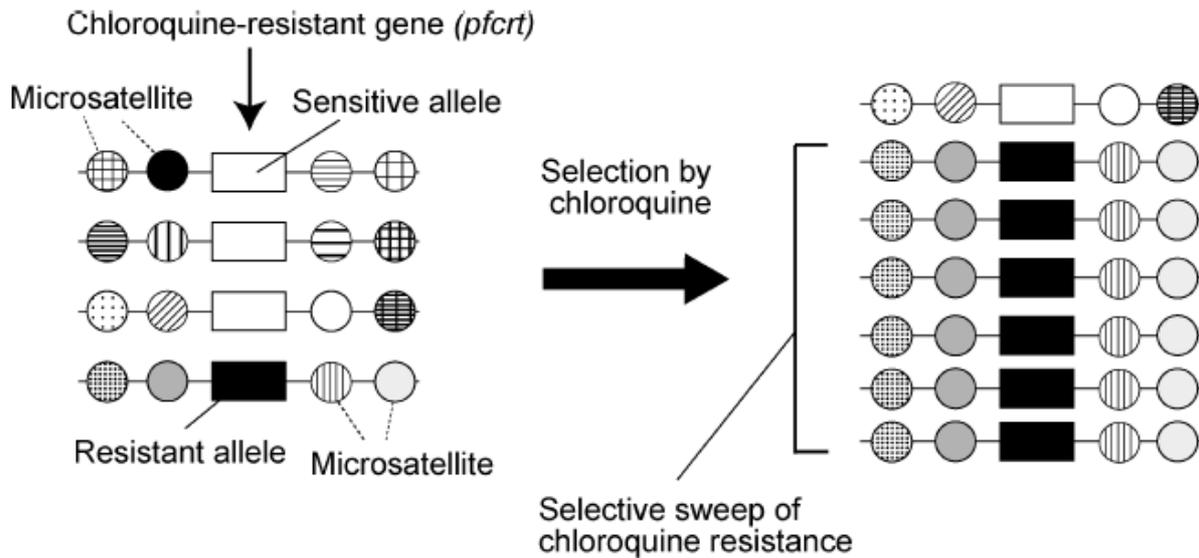


Figure 8: Mécanisme de sélection par la chloroquine des allèles de résistance (extrait de Mita et Tanabe, 2012).

Pfcr1 aurait également, selon certains auteurs, une influence sur l'effet des dérivés de l'artémisinine et des molécules partenaires. Une transfection *in vitro* du gène mutant *Pfcr1* pourrait entraîner une augmentation de la sensibilité à l'artémisinine, à la méfloquine, ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'amodiaquine [62]. Les études *in vivo* ont, quant à elles, montré que l'association artémether+luméfantrine sélectionne la souche sauvage K76 alors que l'amodiaquine et l'association artésunate+amodiaquine sélectionne la souche mutante 76T [67,68,69,70]. La sélection de la mutation serait liée à la pression médicamenteuse des molécules associées dans les CTAs.

- ***Pfmdr1*, *Pfatp6* ou *Pfmrp1***

Les dérivés de l'artémisinine s'accumulent également dans la vacuole digestive du parasite et favorisent l'alkylation des métabolites de l'hémoglobine entraînant la production de radicaux libres. Les mécanismes de résistance n'ont pas encore été élucidés pour ces molécules mais différentes hypothèses ont été proposées suite à la mise en évidence de nouveaux gènes décrits comme pouvant être impliqués dans la résistance aux antipaludiques : gènes codant pour la MultiDrug Resistance 1 protein (*Pfmdr1*), la protéine ATP6 (*Pfatp6*) ou la Multidrug Resistance Protein (*Pfmrp1*).

PfMDR1 est un transporteur de l'ATP, de la famille des ATP-binding cassette (ABC). Il se localise dans la membrane de la vacuole digestive, au travers de laquelle il transporte les molécules et les substrats [71]. Il peut moduler la réponse à de nombreuses molécules structurellement différentes, incluant les dérivés de l'artémisinine et leurs partenaires.

Des mutations ponctuelles du gène *Pfmdr1* peuvent altérer le transport en affectant la spécificité des substrats [72]. Elles seraient associées à des altérations de la susceptibilité, principalement *in vitro*, pour l'amodiaquine, la méfloquine, la chloroquine, la luméfantrine, l'artémisinine, l'artésunate et la dihydro-artémisinine [73,74,75].

L'amplification du nombre de copies du gène *Pfmdr1* est associée à une diminution de la susceptibilité *in vitro* à la méfloquine et à l'artésunate, alors que la diminution du nombre de copies est associée à une augmentation de la susceptibilité à la méfloquine, à la luméfantrine et à l'artémisinine [76,77].

Enfin, *in vivo*, l'amplification du nombre de copies du gène *Pfmdr1* est associée aux échecs thérapeutiques à la méfloquine, à l'artésunate+méfloquine et à l'artémether+luméfantrine dans la sous-région du Grand Mékong [78,79,80,81].

Le transporteur PfATP6, équivalent du SERCA chez les mammifères (Sarco/endoplasmic reticulum CA²⁺-ATpase), a été proposé comme étant à l'origine d'un des principaux mécanismes de la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Il permet le transport du calcium impliqué dans la régulation de nombreux processus chez *P. falciparum*, tels que l'invasion des cellules de l'hôte, la différenciation gamétocytaire ou la synchronisation du cycle parasitaire suite à la production de mélatonine par l'hôte [82,83,84]. En raison de la structure similaire des dérivés de l'artémisinine avec la thapsigargin, inhibiteur du SERCA, il a été supposé que les dérivés de l'artémisinine seraient des inhibiteurs spécifiques de PfATP6 [85,86]. Deux marqueurs moléculaires de résistance à l'artémether ont été proposés, *Pf ATP6* S769N et A623E, basé sur les résultats de tests *in vitro*, mais sans confirmation *in vivo* [87,88]. Ces résultats restent cependant très controversés [89].

Les investigations portant sur l'association entre les variations du gène et la baisse de susceptibilité à l'artémisinine ont permis de mettre en évidence la présence d'autres mutations ponctuelles. Mais jusqu'ici, aucun de ces marqueurs candidats n'a pu être corrélé au phénotype de résistance à l'artémisinine observé à la frontière Thaïlande – Cambodge [90].

Enfin, les MRPs appartiennent à la famille des ABC transporteurs. Une étude récente *in vitro* a montré le rôle de *Pfmrp1*, gène codant pour la protéine MRP1, dans la résistance aux molécules suivantes : chloroquine, quinine, artémisinine, pipéraquline ou primaquine. Cette protéine agirait en exportant les molécules hors de la cellule [91]. L'implication de *Pfmrp1* chez *P. falciparum* a été mise en évidence dans la réponse *in vivo* aux CTAs [92].

- **Cytochrome b**

L'atovaquone a une action sur le cytochrome b en diminuant la production d'ATP et en bloquant la fabrication des acides nucléiques. Des mutations associées à une résistance à l'atovaquone ont été mises en évidence sur le gène du *cytochrome b* de *Toxoplasma gondii*, de *P. berghei* et de *P. falciparum* [93,94,95,96]. La mutation ponctuelle sur le codon 268 du gène du *cytochrome b* (remplaçant Tyr par Asn, Ser ou Cys) aurait un effet délétère sur le site de fixation de l'atovaquone. La concentration de médicament inhibant 50% de la croissance parasitaire est augmentée d'un facteur 1000 en présence de cette mutation [97].

- ***Pfmdt* et *PfTetQ***

Les antibiotiques comme l'azithromycine, la doxycycline et la clindamycine agissent dans l'apicoplaste (contenant l'ADN circulaire) où ils inhibent la traduction de la protéine.

La baisse de sensibilité *in vitro* à la doxycycline, antibiotique combiné à la quinine en curatif ou utilisé seul en chimioprophylaxie, a été associée à l'amplification du nombre de copies pour les gènes *Pfmdt* ou *PftetQ*. Le polymorphisme de séquence du gène *PftetQ* serait également un marqueur moléculaire potentiel de la diminution de sensibilité des isolats de *P. falciparum* à la doxycycline [98,99].

Malgré les nombreux succès dans l'identification des marqueurs moléculaires associés à la résistance, des études complémentaires restent nécessaires pour identifier ceux impliqués dans la résistance aux nouvelles molécules disponibles. De nombreux marqueurs ont été proposés pouvant jouer un rôle dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, mais aucun n'a jusqu'ici été validé comme marqueur unique de résistance.

1.2.2.2 Avantages et limites des tests moléculaires dans la détection de résistance

Ces tests présentent de nombreux avantages cités ci-dessous :

- L'étude d'une quantité importante d'isolats sur une courte période est possible.
- De faibles contraintes logistiques sont liées à la collection, au stockage et au transport des isolats.
- Les échantillons de sang prélevés sur papier filtre peuvent être conservés sur une durée de plusieurs mois.
- La surveillance spatiale et temporelle de la résistance à partir des marqueurs moléculaires permet une cartographie rapide des profils de résistance aux antipaludiques au niveau national, voire international. La difficulté à obtenir une connaissance précise des profils de réponse au traitement dans n'importe quelle situation peut être compensée par l'utilisation de ces marqueurs. S'ils sont suffisamment bien corrélés aux échecs thérapeutiques (cas des antifoliques), ils aident à prévoir leur importance dans un endroit donné, en situation d'épidémie ou suite à des changements de politique de santé [100,101,102]. C'est une preuve directe qu'un échec à un traitement curatif ou à une prophylaxie est le résultat de la sélection d'une population de parasites résistants.

Certains inconvénients ont néanmoins été identifiés:

- Les marqueurs de résistance n'ont pas encore été clairement identifiés pour un grand nombre de molécules disponibles (tels que les dérivés de l'artémisinine).

- Une bonne corrélation avec les échecs cliniques n'a pas encore été établie pour une grande partie des marqueurs moléculaires. Les tests moléculaires ne peuvent donc pas être utilisés au niveau individuel. La détection de parasites mutants n'entraîne pas systématiquement la non-réponse du patient au traitement. L'issue dépend également de l'immunité, de la pharmacocinétique ou d'autres facteurs internes [50,79,103,104].
- Il existe une hétérogénéité dans les méthodes et un manque de standardisation entre les différents laboratoires.
- Enfin, la présence d'infections mixtes, courantes dans les zones de forte endémicité, peut masquer les populations de parasites résistants au détriment des populations sensibles, surtout si les méthodes manquent de sensibilité.

De nombreux défis à la recherche restent donc à accomplir avant que les tests moléculaires soient utilisés par les décideurs de santé de publique pour modifier les stratégies de politique nationale de santé [105].

1.2.2.3 L'évaluation par les tests de susceptibilité in vitro

Les tests de susceptibilité *in vitro* sont complémentaires des autres tests évaluant la résistance. Ils permettent la mesure de la susceptibilité intrinsèque du parasite *P. falciparum* en culture, quantifiée à l'aide du degré d'inhibition de la croissance parasitaire en présence de doses croissantes de médicament. Les marqueurs phénotypiques de résistance sont la CI50 (concentration d'inhibition 50%) disponibles pour tous les antipaludiques. Même si les seuils de résistance sont rarement validés par manque de consensus international, des seuils de diminution de la sensibilité des antipaludiques sont proposés.

De nombreux tests sont disponibles pour évaluer la croissance parasitaire à travers le métabolisme et la maturation du *Plasmodium*. Une comparaison des méthodes disponibles est résumée (**Tableau 5**) [106].

INTRODUCTION

	Microtest de l'OMS	Test radio-isotopique	Test enzymatique pLDH ELISA	Test DELI	Test HRP2	SYBR GREEN
Sensitivité	Elevée	Moyenne	Faible	Elevée	Elevée	Moyenne
Temps de culture	24h	42h (jusqu'à 72h)	48h	48h	48-72h	72h
Evaluation de l'inhibition de la croissance parasitaire	Microscopie (évaluant la maturation des schizontes par dosage morphologique)	Incorporation de l'hypoxanthine tritiée	activité enzymatique de pLDH	Test ELISA utilisant des anticorps contre pLDH	Test ELISA utilisant des anticorps contre HRP2	Fluorimétrie après incorporation d'un intercalant de l'ADN
Besoins d'équipement	Faible (microscope)	Important (Compteur à scintillation liquide)	Modéré (lecteur de plaques)	Modéré (lecteur de plaques ELISA)	Modéré (lecteur de plaques ELISA)	Modéré (fluorimètre)
Quantité de travail requise	Elevée	Faible	Faible	Moyenne	Faible	Faible
Année de publication ; référence	1978 [107]	1979 [108]	1993 [109]	2001 [110]	2002 [111]	2004 [112]

Tableau 5: Comparaison des tests d'évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* au médicament (adapté de Noedl et al., 2003)*

*Abbréviations : DELI, double site enzyme-linked LDH immunodetection ; ELISA enzyme-linked immunosorbent assays ; HRP2, histidine-rich protein 2 ; pLDH, parasite lactate dehydrogenase

Ces tests comportent de nombreux avantages dans la surveillance des résistances [113] :

- Ils offrent une approche objective et quantitative dans la détermination de la résistance.
- Ils facilitent l'élimination de certains facteurs confondants observés dans les tests *in vivo* (tels que l'immunité de l'hôte ou la biodisponibilité du médicament) par le contact direct entre les parasites et la concentration médicamenteuse. Pourtant, un biais de sélection n'est pas à exclure car les souches n'arrivent pas toutes à être cultivées. Ce biais peut varier selon si les tests sont réalisés *in vitro*, sur des parasites établis en culture, ou *ex-vivo*, par maturation des isolats et en absence de cryoconservation ou d'adaptation en culture.
- Ils permettent d'analyser un même échantillon vis-à-vis d'un grand nombre de molécules différentes ou de tester une seule des molécules composant une association thérapeutique.
- Ils aident à déterminer la sensibilité de base des nouvelles molécules avant leur introduction dans les stratégies thérapeutiques nationales et à évaluer les changements

de susceptibilité pour les anciennes molécules, retirées des recommandations nationales.

- Ils permettent d'analyser les résistances croisées, la synergie ou l'antagonisme de plusieurs molécules ; et de comparer la sensibilité des souches sur différents sites, dans un ou plusieurs pays.
- Enfin, utilisés en routine, ces tests permettent de décrire les tendances et les évolutions des résistances dans le temps ; en particulier pour les molécules dont les seuils de sensibilité ne sont pas encore déterminés. Ils peuvent alerter précocement de l'émergence de la résistance aux premières et deuxième lignes de traitement, avant que celle-ci ne soit cliniquement apparente.

Pourtant, certaines limites subsistent essentiellement dues à la difficulté de standardiser les méthodes entre les différents laboratoires. Chaque test ayant un critère d'évaluation différent, l'interprétation des résultats va dépendre du test utilisé [32]. Les résultats, exprimés en CI50, sont le produit de différents facteurs, i.e. l'hématocrite, la parasitémie initiale, le volume de distribution dans les puits, la précision de l'ajout de doses picomolaires de médicament, etc. Les résultats peuvent donc être hétérogènes entre les laboratoires et au cours du temps. En absence de protocoles standards pour les études *in vitro* de terrain, les résultats sont difficilement comparables entre eux. Les isolats frais sont souvent plus représentatifs que les isolats cultivés *in vitro*. Ces derniers ont plus de risque de se modifier génétiquement après adaptation en culture et de sélectionner les souches résistantes. Enfin, l'exposition *in vivo* à la molécule reste difficilement reproductible par les méthodes *in vitro*.

Il est recommandé de conduire les tests *in vitro*, réalisés en zone endémique, dans un nombre limité de structures de référence en raison de la complexité et du coût élevé de la technique. Ainsi, les ressources peuvent être mutualisées et les méthodes standardisées.

La complexité des méthodes d'évaluation de la résistance participe à la difficulté de mettre en place une surveillance efficace, continue et standardisée de l'efficacité et de la résistance aux antipaludiques en zone endémique.

1.2.3 Traitements antipaludiques disponibles et résistance avant l'ère des CTAs

Le choix des médicaments proposés en première et deuxième ligne de traitement s'appuie sur de nombreuses caractéristiques telles que l'efficacité du traitement, la sensibilité du parasite à la molécule, la gravité des manifestations cliniques, la voie d'administration, le coût du produit ainsi que l'acceptabilité par le patient (souvent liée à la présence ou non d'effets secondaires).

Dans leur grande majorité, les antipaludiques, naturels ou de synthèse, sont uniquement actifs sur les formes sanguines intra-érythrocytaires asexuées du parasite et n'ont d'activité ni sur les stades initiaux intra-hépatiques, ni sur les gamétocytes sanguins. Ils appartiennent à différentes classes chimiques qui leur confèrent à chacun des propriétés spécifiques [114]. On compte :

- la classe des amino-4-quinoléines comprenant, entre autres, la chloroquine, l'amodiaquine et la pipéraquline ;
- la classe des amino-alcools avec la quinine, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine ;
- la classe des antifoliques, antifoliniques avec les sulfamides, la sulfone, le proguanil et la pyriméthamine ;
- la classe des hydroxynaphto-quinones avec l'atovaquone ;
- les antibiotiques de la classe des cyclines avec la doxycycline ;
- et enfin la classe des sesquiterpène lactones avec l'artémisinine et ses dérivés : dihydro-artémisinine, artémether et artésunate.

1.2.3.1 La quinine

La quinine a été la première molécule contre le paludisme isolée de l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis*), par les pharmaciens Pelletier et Caventou en 1820. Les vertus curatives de cette plante étaient connues depuis le XVII^{ème} siècle en Amérique du Sud. En dépit d'une utilisation répandue de la quinine, surtout dans le paludisme compliqué et celui de la femme enceinte, les résistances à cette molécule restent faibles. Les premiers cas documentés de résistance ont été rapportés au Brésil en 1910 et en Asie du Sud-Est dans les années 60s. La prévalence des résistances s'est accrue dans les années 80s [115,116,117].

1.2.3.2 La chloroquine

De la fin des années 1940s aux années 1990s, la chloroquine fut la principale molécule utilisée très largement au niveau mondial dans la lutte antipaludique. Son efficacité, ses propriétés antipyrétiques, sa bonne tolérance ainsi que son faible coût lui ont conféré pendant très longtemps le statut de première ligne de traitement contre le paludisme. Cependant, très rapidement, la résistance à la chloroquine a émergé dans deux foyers indépendants, en Colombie en 1959, puis en Thaïlande en 1959-1960 avant de s'étendre à toute l'Asie et l'Amérique [118,119,120]. Les côtes africaines ont été touchées en 1978 avec l'apparition des premiers cas de résistance au Kenya et en Tanzanie [121,122]. La progression vers l'Afrique Centrale et l'Afrique du Sud s'est ensuite faite lentement entre 1982 et 1985, avant de se stabiliser en Afrique de l'Ouest à partir de 1985 [123,124,125]. La résistance à la chloroquine est actuellement rapportée dans l'ensemble des zones endémiques, à l'exception de l'Amérique Centrale et de la zone Caraïbe [34].

1.2.3.3 La sulfadoxine+pyriméthamine

Dans l'espoir de renforcer le stock de molécules antipaludiques disponibles, la bithérapie SP a été développée dans les années 1960s. Il était pourtant connu que la résistance à la pyriméthamine, comme à son analogue le proguanil, était d'émergence immédiate. Ce fut rapidement confirmé par l'apparition de résistance à l'association SP quelques années après son introduction. Les échecs thérapeutiques restent faibles dans de nombreux pays d'Amérique du Sud, du Moyen-Orient et d'Asie Centrale avec une médiane de prévalence des échecs de près de 5%. Des niveaux très élevés de résistance, pouvant atteindre une prévalence de 50%, sont actuellement présents en Asie, en Afrique de l'Est et du Sud et dans les régions d'Amazonie [18,61]. La diffusion rapide des résistances à la SP s'explique en partie par la longue demi-vie des deux molécules constituant l'association. La présence de concentrations sanguines sub-thérapeutiques sur de longues périodes augmente le risque de développer des résistances. De plus, la présence de résistances croisées avec d'autres antifoliques, comme le triméthoprime+sulfaméthoxazole, qui est largement utilisé comme antibiotique depuis les années 30s ou en prévention des infections opportunistes dans le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), est également un facteur de diffusion des résistances [20,126].

1.2.3.4 L'amodiaquine

L'amodiaquine a été synthétisée peu après la chloroquine dans les années 40s. Cette molécule a été longtemps sous-exploitée malgré une meilleure efficacité que son analogue, la chloroquine. L'émergence de résistances à la chloroquine a soulevé un regain d'intérêt pour l'amodiaquine dans les années 90s. Pourtant, une utilisation intensive de l'amodiaquine en monothérapie a participé au déclin de son efficacité dans les quelques zones d'Afrique et d'Asie où elle a été recommandée [127]. L'efficacité thérapeutique de la monothérapie est hétérogène sur le continent africain. Des taux d'échec supérieurs à 20% ont été rapportés en Afrique Centrale, de l'Est et du Sud, alors que la médiane se situe aux environs de 10% en Afrique de l'Ouest [34]. La monothérapie est actuellement proscrite des recommandations OMS, favorisant son utilisation en association à un dérivé de l'artémisinine.

1.2.3.5 La méfloquine

La méfloquine, issue du programme de criblage de l'armée américaine pendant la guerre du Vietnam a été développée dans les années 70s, suscitant de nombreux espoirs dans le traitement des accès simples à *P. falciparum* chimiorésistants [128]. Pourtant, son utilisation a été restreinte en raison de ses effets secondaires neuro-psychiatriques et de son coût élevé. La très longue demi-vie de la méfloquine reste cependant un atout pour son utilisation en prophylaxie hebdomadaire dans les zones de chloroquino-résistance et pour son action complémentaire dans certaines associations. La résistance à cette molécule a été détectée quelques années après son introduction, près de la frontière Thaïlande-Cambodge [129]. Les taux de prévalence des résistances sont actuellement élevés au Myanmar, en Thaïlande, au Cambodge, et au Viêt Nam alors qu'ils restent faibles (n'excédant pas les 10%) dans les quelques pays d'Amazonie et d'Afrique, où l'efficacité thérapeutique de la monothérapie a été testée [34]. L'acquisition rapide de résistance s'explique par plusieurs facteurs. La longue demi-vie de cette molécule expose, sur une plus longue période, le parasite à des concentrations sub-thérapeutiques. L'amplification du gène *pfmdr1* s'acquière relativement rapidement [130]. Enfin, l'utilisation répandue de la méfloquine sous-dosée en monothérapie du paludisme présumé dans la région du Grand Mekong, a participé à la sélection des souches résistantes. Comme l'amodiaquine, la méfloquine en monothérapie est actuellement déconseillée, et son association à un dérivé de l'artémisinine est fortement recommandée.

1.2.3.6 L'atovaquone+proguanil

L'atovaquone, issue d'une recherche initiée au Royaume-Uni à la fin de la seconde guerre mondiale a été mise sur le marché pour le traitement des leishmanioses et des pneumonies à *Pneumocystis jiroveci*. Elle a montré, par la suite, une bonne réponse dans les accès non compliqués à *P. falciparum* [131,132]. Après que cette molécule administrée en monothérapie ait conduit à des taux de recrudescence pouvant atteindre près de 30%, la combinaison atovaquone+proguanil a été proposée, démontrant très largement une bonne efficacité clinique [133,134]. Cependant, le coût élevé de cette association limite son utilisation aux voyageurs de retour de zone endémique. Les échecs thérapeutiques à cette combinaison attribuables à une résistance parasitaire sont peu fréquents. Une mauvaise absorption de l'atovaquone, molécule lipophile nécessitant un repas riche en graisse lors de son administration, est souvent en cause [97,135]. La faible disponibilité de ce traitement a permis jusqu'ici de minimiser la pression médicamenteuse et de protéger cette association du développement de résistance. Néanmoins, la présence d'une mutation ponctuelle du gène du *cytochrome b* en position 268 a été hautement associée à la résistance à l'atovaquone et a pu être observée en zone d'endémie, en particulier en Guyane française [136]. Des cas de résistance ont été rapportés chez des voyageurs de retour de zones endémiques, faisant penser que cette association aurait une courte durée de vie si elle était largement distribuée [137,138,139].

1.2.4 Stratégies thérapeutiques pour les populations à risque

Certains groupes de population sont particulièrement à risque de contracter un paludisme tels que:

- les jeunes enfants vivant dans des zones de transmission stable, et n'ayant pas encore développé une immunité protectrice contre les formes les plus sévères ;
- les femmes enceintes non immunisées, dont une infection à *plasmodium* peut être cause de fausses couches ou de décès maternels précoces ;
- les femmes enceintes semi-immunisées dans les régions de forte transmission, dont le risque de fausses couches ou de faible poids de naissance chez les nouveau-nés est augmenté (particulièrement lors de la première et de la seconde grossesse) en cas d'infection à *plasmodium*;

- les femmes enceintes semi-immunisées et VIH positives, dans des zones de transmission stable, pour lesquelles le risque de contracter un paludisme au cours de toute leur grossesse est plus élevé (le risque de transmettre l'infection à VIH aux nouveau-nés est augmenté en cas d'infection palustre du placenta) ;
- les personnes vivant avec le VIH/sida ;
- les voyageurs internationaux en provenance de régions non endémiques ou les immigrants de retour dans leur pays d'origine pour visiter leurs amis ou famille, étant pour la plupart peu voire non immunisés.

Des stratégies préventives, détaillées ci-dessous, sont proposées pour ces groupes à risque afin de réduire les risques de développer une infection à *plasmodium* ou d'évoluer vers une forme sévère.

1.2.4.1 Stratégies de prévention saisonnière

Récemment les stratégies de prévention ont évolué d'une approche unique en toute situation vers un ciblage des antipaludiques pour des populations et des périodes spécifiques. Dans les zones de forte transmission, un traitement préventif intermittent (TPI) de trois doses de SP (Fansidar®) est proposé pour les nourrissons en même temps que les vaccinations systématiques. De plus, l'OMS recommande depuis 2012 la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) pour l'enfant de moins de 5 ans, comme stratégie complémentaire de prévention antipaludique pour le Sahel. Le risque de morbi-mortalité attribuable au paludisme dans cette région est particulièrement augmenté en saison des pluies. L'administration régulière d'un traitement antipaludique au cours de cette période s'est avérée efficace, avec une diminution de 80% du risque d'infection chez l'enfant, sûr et à faible coût. Elle repose sur l'administration régulière une fois par mois pendant la saison de forte transmission (sans dépasser les 4 doses au total), d'amodiaquine et de SP, pour tous les enfants de moins de 5 ans. L'objectif est de maintenir des concentrations sanguines d'antipaludiques suffisantes chez les enfants au cours de la période où le risque palustre est le plus élevé [140,141].

1.2.4.2 Stratégie de prévention chez la femme enceinte

Chez la femme enceinte, particulièrement vulnérable en raison de l'infestation placentaire, le TPI est recommandé en zone de forte transmission contre la transmission congénitale du

paludisme. Il consiste à administrer deux doses curatives d'un antipaludique, avec un minimum d'un mois d'intervalle, à des moments prédéterminés de la grossesse (généralement lors des visites prénatales programmées après le premier trimestre)[142].

Actuellement, l'association SP, qui rassemble les critères de bonne tolérance et de demi-vie longue, est le TPI de choix au cours de la grossesse. Ce traitement a démontré son efficacité dans la prévention des petits poids de naissance, de l'anémie maternelle et de l'infection du placenta [143,144,145]. Pourtant, la diffusion de résistances à la SP en Afrique subsaharienne inquiète quant à l'utilisation durable de cette combinaison dans le TPI.

1.2.4.3 Stratégie de prévention chez la femme enceinte infectée par le VIH

Pour les femmes enceintes infectées par la VIH, une dose journalière de cotrimoxazole (triméthoprime+sulfaméthoxazole) est recommandée en prophylaxie des infections opportunistes lorsque le taux de CD4 est inférieur à 500/mm³. Le TPI par SP n'est pas recommandé dans ce cas [146]. En effet, le cotrimoxazole et la SP ayant tous deux une action anti-folate ne peuvent pas être administrées de façon concomitante, au risque de voir apparaître des effets délétères graves [147]. Le risque d'apparition d'effets indésirables est majoré, notamment pour les réactions cutanées graves.

1.2.4.4 Stratégies thérapeutiques du voyageur de retour en France de zone d'endémie

Pour les voyageurs, la chimioprophylaxie recommandée dépend de la zone d'endémie visitée, du niveau de transmission, de l'âge, des co-morbidités et des intolérances [148]. En avril 1999 (révisé en 2007), la 12^{ème} Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française a défini quatre grands groupes, en fonction des résistances à la chloroquine, au proguanil, à la méfloquine et à la quinine [149,150]:

- le groupe 0, composé des pays indemnes de paludisme ;
- le groupe 1, composé des pays indemnes de paludisme à *P. falciparum* (ou si présent, la sensibilité à la chloroquine est conservée) et des pays touchés par *P. vivax* ;
- le groupe 2, composé des zones de chloroquino-résistance ;
- le groupe 3, composé des zones de prévalence élevée de chloroquino-résistance ou de multirésistance pour *P. falciparum*. Ce groupe inclut la quasi-totalité de l'Afrique tropicale, le Bassin Amazonien et les Guyanes, les zones frontalières de la

Thaïlande avec le Cambodge, le Laos et le Myanmar, la Chine (Yunnan et Haïnan), le Bangladesh, l'Irian Jaya en Indonésie et la Papouasie-Nouvelle-Guinée.

1.2.5 Evolution vers les stratégies thérapeutiques à base d'artémisinine

L'isolement de l'artémisinine ou Qinghaosu en 1972, sous la direction du professeur Youyou Tu, fait partie des progrès décisifs dans la lutte contre le paludisme. Les extraits de la plante *Artemisia annua*, dont dérive l'artémisinine, étaient utilisés depuis plus de quinze siècles en médecine traditionnelle chinoise. Dans le contexte de la guerre du Vietnam, la course à la découverte d'antipaludiques, pour lutter contre les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine, devint une priorité pour l'armée américaine d'un côté et pour le gouvernement chinois de l'autre, en soutien à l'armée populaire du Vietnam du Nord. Alors que la méfloquine fut découverte à cette période par les américains, le projet 523 impliquant plus de 500 scientifiques, permit l'isolement de l'artémisinine par les chinois. Aucune publication scientifique n'était disponible en cette période en raison du contexte difficile de la révolution culturelle en Chine [151].

Ces molécules très actives avec une courte demi-vie de quelques heures agissent sur les stades précoces du parasite. Ils réduisent de plus de 10 000 fois la biomasse parasitaire par cycle asexué. Leur propriété gamétocytocide participe à la réduction de la transmission du paludisme [24]. La bonne efficacité et tolérance de ces molécules ont permis leur large utilisation dans le traitement du paludisme compliqué et non compliqué. Néanmoins, leur élimination très rapide impose soit des traitements longs, soit une association avec des molécules à longue demi-vie, sous peine d'observer un taux de rechute important (**Figure 9**).

Les associations thérapeutiques ont été utilisées avec succès dans le traitement des cancers, de la tuberculose ou du VIH avant d'être proposées dans le paludisme. L'indépendance du mode d'action de chacune des molécules lors de l'administration d'une combinaison thérapeutique permet de retarder l'émergence de résistance. Parfois, les composants de l'association sont synergiques. La résistance à une association de deux molécules ayant des mécanismes d'action différents est rare. La probabilité que la résistance se développe simultanément pour les deux molécules serait le produit de la fréquence de mutation des gènes associés à la résistance de chacune des molécules; lui-même multiplié par le nombre de parasites dans une infection [24].

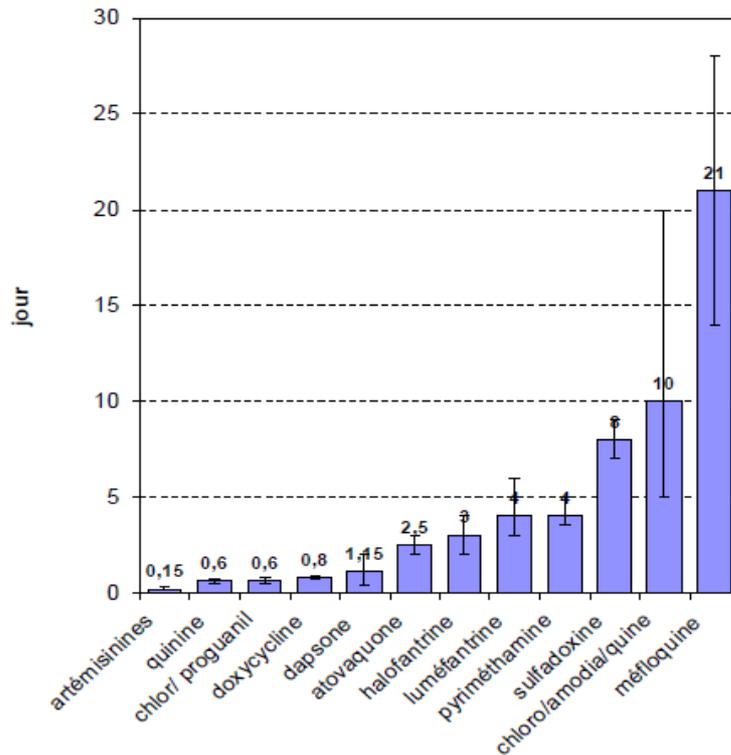


Figure 9: Demi-vie d'élimination sanguine des antipaludiques (extrait de Danis et Pichard, 2003)

Les CTAs associent un dérivé de l'artémisinine (artésunate, artémether ou dihydro-artémisinine) à courte demi-vie, et une molécule partenaire, classiquement une amino-quinoléine (amodiaquine, pipéraquine), un amino-alcool (méfloquine, luméfanztrine) ou la SP, à plus longue demi-vie.

1.2.5.1 Stratégies thérapeutiques du paludisme non compliqué

Les dérivés d'artémisinine ont été largement utilisés en Asie sous forme de monothérapie depuis leur découverte dans les années 70s. Puis, dans les années 90s, les CTAs ont commencé à être commercialisées dans les régions endémiques d'Asie du Sud-Est. L'introduction de ces combinaisons dans la plupart des pays d'Afrique a été retardée jusqu'au milieu des années 2000s, en raison des contraintes financières, du manque de volonté politique ou de l'insuffisance des capacités logistiques et des infrastructures sanitaires [152]. A l'heure actuelle, les CTAs constituent la première ligne de traitement dans les infections palustres non compliquées à *P. falciparum* en zone endémique. Ces recommandations à grande échelle s'expliquent principalement par une bonne tolérance et une efficacité fiable

INTRODUCTION

des dérivés de l'artémisinine. En effet, les CTAs atteignent des taux de guérison supérieurs à 95 % à J28. Les politiques nationales de traitement antipaludique ne sont modifiées que si les taux de guérison descendent sous le seuil de 90% [7].

Les CTAs, qui rassemblent l'ensemble des conditions requises pour un contrôle efficace du paludisme, sont préconisées sous forme de cinq principales associations (**Tableau 6**) [7]. Des doses fixes ou non fixes pour chacune des molécules présentes dans la combinaison peuvent être proposées. Cependant, l'utilisation de combinaisons à dose fixe reste préférable par rapport aux combinaisons co-emballées ou aux comprimés en vrac. L'adhésion au traitement est ainsi favorisée et l'utilisation potentielle de médicaments en monothérapie est diminuée [153]. Les combinaisons à dose fixe sont désormais disponibles pour chaque CTA recommandé, à l'exception de la combinaison artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine. Les combinaisons artémether+luméfantrine et artésunate+amodiaquine sont les CTAs les plus utilisées en Afrique, alors que les associations artésunate+méfloquine, artésunate+SP et dihydro-artémisinine+pipéraquline sont prédominantes en Amérique du Sud, au Moyen-Orient et en Asie du Sud-Est [154] (**Figure 10**).

	Préparation	Posologie standard
Artémether + Luméfantrine	Combinaison à dose fixe (artémether 20mg et luméfantrine 120mg).	Deux fois par jour pendant trois jours.
Artésunate + Amodiaquine	Disponible en comprimés en vrac et en préparation à dose fixe (artésunate 25mg et amodiaquine 67.5mg).	Une fois par jour pendant trois jours.
Artésunate + Méfloquine	Disponible en comprimés en vrac et en préparation à dose fixe (adultes : méfloquine 100mg et artésunate 220mg; pédiatrique : méfloquine 55mg et artésunate 25mg).	Artésunate: une fois par jour pendant trois jours, avec une dose de méfloquine fractionnée pendant 2-3 jours.
Artésunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine	Disponible en comprimés en vrac. Pas de doses fixes disponibles.	Une fois par jour d'artésunate pendant trois jours et une dose unique de SP.
Dihydro-artémisinine + Pipéraquline	Combinaison à dose fixe (Adulte: dihydro-artémisinine 40mg et pipéraquline 320mg).	Une fois par jour pendant trois jours.

Tableau 6: Cinq principales combinaisons à base d'artémisinine actuellement recommandées par l'OMS (adapté du rapport OMS, 2010)

INTRODUCTION

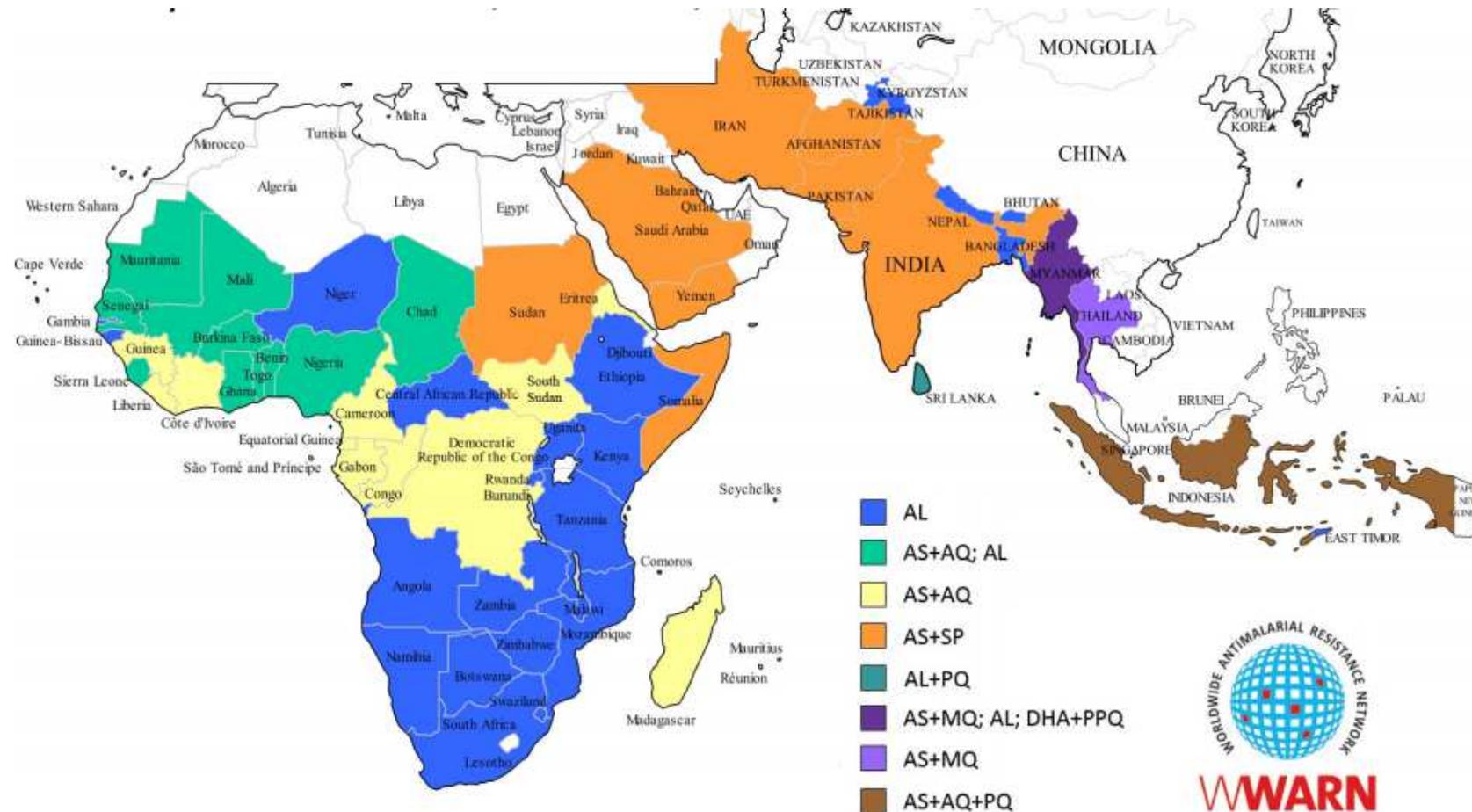


Figure 10: La répartition par pays des CTAs comme première ligne de traitement (Extrait de WorldWide Antimalarial Resistance Network, 2012, source: OMS, http://www.who.int/malaria/am_drug_policies_by_region_afro/)

AL : artémether+luméfantrine ; *AS+AQ* : artésunate+amodiaquine ; *AS+SP* : artésunate+sulfadoxine+pyriméthamine ; *PQ* : primaquine ; *AS+MQ* : artésunate + méfloquine ; *DHA+PPQ* : dihy-droartémisinine+pipéraquline

Une méta-analyse, réalisée à partir de la base de données Cochrane, a comparé les bénéfices et les limites de six schémas thérapeutiques disponibles ; cinq combinaisons incluant un dérivé de l'artémisinine (artésunate+amodiaquine, artésunate+SP, artésunate+méfloquine, artémether+luméfantrine et dihydro-artémisinine+pipéraquline) et une association composée d'amodiaquine+SP; pour 46 essais cliniques conduits entre 2003 et 2009 [155]. Toutes les CTAs testées ont montré des taux d'échecs parasitologiques tardifs inférieurs à 10% après 28 jours, sans distinction entre la recrudescence et la réinfection. L'efficacité des CTAs s'est avérée supérieure à l'association sans artémisinine en Afrique de l'Est (artémether+luméfantrine *versus* amodiaquine+SP: Risque Relatif (RR) d'échec thérapeutique=0,12, intervalle de confiance 95% IC95% [0,06-0,24] ; artésunate+amodiaquine *versus* amodiaquine+SP: RR=0,44, IC95% [0,22-0,89]). L'association dihydro-artémisinine+pipéraquline a montré une efficacité supérieure aux autres CTAs (*versus* artésunate+méfloquine en Asie : RR d'échec thérapeutique=0,39, (IC95%) [0,19-0,79]; *versus* artémether+luméfantrine en Afrique : RR=0,39, IC95% [0,24-0,64]).

Pour protéger ces molécules du risque d'émergence de résistance, l'OMS recommande un arrêt complet de la commercialisation des dérivés de l'artémisinine en monothérapie par voie orale et une substitution par les CTAs. Pourtant, fin 2010, les monothérapies continuaient à être autorisées pour la commercialisation dans près de 25 pays, en majorité africains (contre 37 en 2009), et continuaient à être fabriquées dans près de 39 industries pharmaceutiques, en majorité implantées en Inde [34].

1.2.5.2 Stratégies thérapeutiques du paludisme compliqué

La quinine intra-veineuse (IV) ou l'artésunate IV en monothérapie sont actuellement les deux molécules de choix dans le paludisme compliqué. Cependant, l'artésunate a récemment démontré une efficacité supérieure sur le taux de mortalité dans deux essais cliniques multicentriques randomisés réalisés en Asie du Sud-Est et en Afrique [156,157]. Dans les zones de multirésistance de *P. falciparum*, l'artésunate IV est maintenant préconisé en cas de paludisme compliqué et remplace peu à peu la quinine [157].

INTRODUCTION

Le **Tableau 7**, ci-dessous, résume les principales thérapeutiques utilisées en zone endémique et non endémique dans le paludisme non compliqué et le paludisme sévère.

	<i>En zone endémique</i>	<i>En zone non endémique</i>
Paludisme non compliqué	artémether + luméfantrine (Coartem®)	atovaquone+proguanil (Malarone®)
	artésunate + amodiaquine (ASAQ Winthrop, Coarsucam®)	artémether+luméfantrine (Riamet®)
	artésunate + méfloquine (Artequin®)	méfloquine (Lariam®)
	artésunate + sulfadoxine + pyriméthamine (Coarinate®)	quinine per os +/- ATB
	dihydro-artémisinine + pipéraquline (Eurartesim®)	
Paludisme sévère	quinine IV	quinine IV
	artésunate IV (Malacef®)	artésunate IV (Malacef®)
Traitement préventif intermittent	SP ou Fansidar® chez la femme enceinte	
Prophylaxie des voyageurs		atovaquone+proguanil
		Méfloquine
		chloroquine (Nivaquine®)
		proguanil (Paludrine®)
		chloroquine+proguanil (Savarine®)
	doxycycline	

Tableau 7: Principales thérapeutiques du paludisme à *P. falciparum*

Au cours du temps, les prix des traitements ont beaucoup évolué vers une augmentation des coûts, liés au développement de nouvelles molécules ou d'associations. La réduction de l'arsenal thérapeutique accentue la nécessité de préserver l'utilisation des molécules actives, incluant les dérivés de l'artémisinine et leurs molécules partenaires. Ce défi est crucial pour contrôler le paludisme, qui reste un problème majeur de santé publique au cours de ce nouveau millénaire.

1.2.6 Emergence de la résistance aux CTAs

L'émergence de la résistance aux antipaludiques, nouvellement introduits dans les stratégies thérapeutiques, est inévitable. Néanmoins, le délai d'apparition d'une résistance est plus ou moins long selon la molécule. La frise chronologique ci-dessous résume l'introduction sur le marché des différents antipaludiques, de la quinine aux CTAs, ainsi que l'émergence des premières résistances à ces molécules (**Figure 11**). Bien que les CTAs n'aient été utilisées qu'à partir de 1994, l'artémisinine en monothérapie était largement utilisée depuis le début des années 70s au Vietnam et au Cambodge [158]. Elle souligne également que de nombreuses molécules telles que la quinine, la chloroquine et la SP, ont continué à être utilisées sur de longues périodes, malgré la détection précoce de résistance.

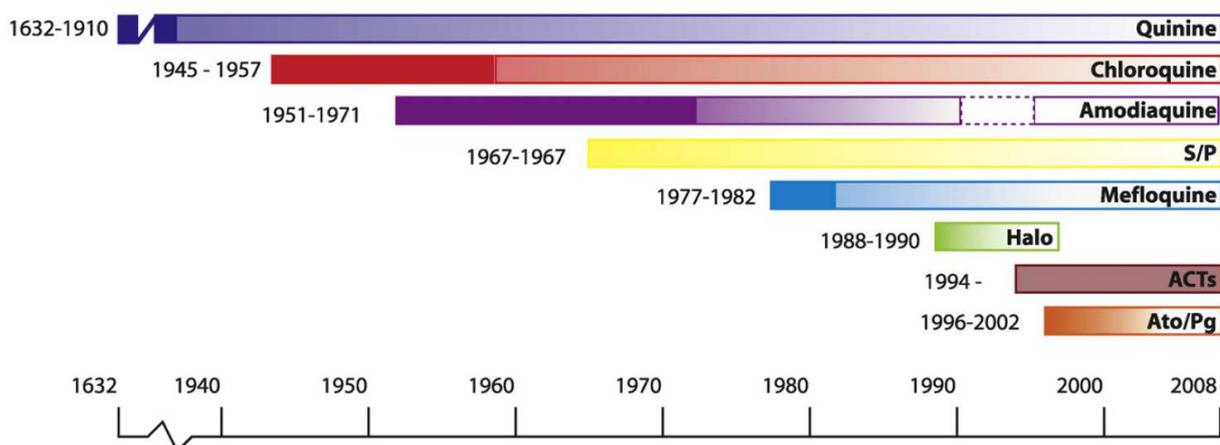


Figure 11: Frise chronologique de l'émergence des résistances aux principaux antipaludiques (d'après Ekland and Fidock, 2008). Chaque barre chronologique colorée représente une molécule ou une association, avec à sa gauche : l'année d'introduction de la molécule et l'année de la première résistance rapportée.

SP: sulfadoxine+pyriméthamine ; Halo : halofantrine; ACTs: artemisinin-based combination therapies; Ato/Pg : atovaquone+proguanil

L'introduction des dérivés de l'artémisinine dans le pipeline des antipaludiques a suscité de nombreux espoirs. La courte demi-vie et la rapidité d'action de ces molécules, et leur association aux molécules partenaires à longue demi-vie, les protégeaient potentiellement du développement des résistances. Pourtant, l'avantage de ces molécules à réduire rapidement les symptômes cliniques, s'est avéré également comme une limite. Les patients, se sentant guéris

dès l'initiation du traitement, peuvent l'arrêter de façon prématurée ; ce qui favorise le développement des résistances. Et alors que l'on pensait ces nouvelles molécules prometteuses protégées, les craintes se sont validées et l'émergence de résistance à l'artémisinine s'est peu à peu confirmée.

A la fin des années 1990s, des réponses cliniques diminuées aux dérivés de l'artémisinine ont été suspectées en Thaïlande, en Inde et en Sierra Leone [159,160,161]. Sur la période 2001-2004, le programme national de contrôle du paludisme du Cambodge a notifié, à travers ses systèmes de surveillance locaux, des taux d'échecs à l'association artésunate+méfloquine de l'ordre de 15% pour un suivi de 28 jours et de 20% pour un suivi de 42 jours dans la province de Pailin [162]. En 2003, l'efficacité de la combinaison artémether+luméfantrine a été testée dans cette région, comme alternative à l'artésunate+méfloquine. Les taux d'échecs thérapeutiques tardifs à J28 s'élevaient à 14% [163]. L'évaluation *in vitro* des isolats des patients testés ne permettait cependant pas de confirmer une résistance aux dérivés de l'artémisinine. Les échecs thérapeutiques observés étaient plutôt attribués à la baisse de sensibilité de la molécule partenaire. D'ailleurs, des corrélations fortes entre l'efficacité de la CTA et celle de la molécule partenaire proposée en monothérapie ont été mises en évidence (pour artésunate+amodiaquine et amodiaquine seule : r^2 (coefficient de corrélation) =0.73; pour artésunate+SP et SP seule : $r^2=0.65$).

Un échec clinique aux CTAs seul, était donc insuffisant pour parler de résistance aux dérivés de l'artémisinine, principalement en raison de la possibilité d'une mauvaise adhérence au traitement, d'une qualité diminuée des médicaments, de variations inter-individuelles concernant l'immunité ou la pharmacodynamie des patients ou d'une réinfection par des parasites sensibles.

Parallèlement, des analyses *in vitro* d'isolats provenant de Guyane française a rapporté des CI_{50} élevées en présence d'artémether [87]. Des modèles animaux de rongeur ont montré l'acquisition d'une résistance stable à l'artémisinine chez *P. chabaudi* sous pression médicamenteuse [164]. Des baisses de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine ont été observées dans la province de Yunnan en Chine à la fin des années 90s, dans des zones où ces molécules étaient largement utilisées. Un essai clinique réalisé en République Centrafricaine a mis en évidence des valeurs de CI_{90} (concentration d'inhibition à 90%) pour la dihydro-artémisinine augmentées d'un facteur 5 entre les isolats de patients guéris et les recrudescences après traitement à l'artésunate monothérapie [165].

Finalelement, une approche intégrée évaluant la résistance selon différents tests a été proposée. Une infection était considérée comme résistante aux dérivés de l'artémisinine si elle répondait à l'ensemble des critères suivants [28,166]:

- Persistance des parasites 7 jours après le début du traitement ou réémergence des parasites 28 jours après le début du traitement ;
- Présence d'une concentration plasmatique de la dihydro-artémisinine, métabolite principal des artémisinines ;
- Temps retardé de la clairance parasitaire ;
- Et susceptibilité *in vitro* du parasite diminuée au dérivé de l'artémisinine.

Une étude réalisée en 2006-2007 à l'Ouest du Cambodge a rassemblé l'ensemble de ces critères confirmant pour la première fois la résistance à des dérivés de l'artémisinine [28]. Des tests *in vivo*, *in vitro*, la caractérisation moléculaire des gènes candidats de résistance et des mesures pharmacocinétiques ont été réalisées sur 60 patients présentant un paludisme non compliqué. Deux patients traités par la monothérapie artésunate 4mg/kg/jour pendant 7 jours étaient en échec thérapeutique porteurs de souches de *plasmodium* à sensibilité réduite.

Puis en 2007-2008, une large étude multicentrique réalisée à l'Ouest du Cambodge et à l'Est de la Thaïlande a comparé les temps de clairance parasitaire entre des patients traités par la monothérapie artésunate et ceux traités par la CTA (artésunate+méfloquine). Une clairance parasitaire retardée a été observée dans la province de Pailin au Cambodge, confirmant la diminution *in vivo* de la susceptibilité aux dérivés de l'artémisinine. Plus spécifiquement, après l'administration d'artésunate monothérapie à la dose de 2mg/kg/jour pendant 7 jours ou l'administration d'artésunate à la dose de 4mg/kg/jour pendant 3 jours suivie de méfloquine 25mg/kg/jour, la médiane du temps de clairance parasitaire était de 84 heures (intervalle interquartile, 60-96) à Pailin versus 48 heures (intervalle interquartile, 36-66) à Wang Pha en Thaïlande ($p=0.001$) (**Figure 12**). Les analyses *in vitro* et moléculaires n'ont pourtant pas confirmé la réduction de sensibilité de *P. falciparum in vivo* à l'artésunate [30].

La résistance n'est pas restée confinée à la région Ouest du Cambodge, puisque des résistances à la combinaison artésunate+méfloquine ont également été détectées dans le Sud du Cambodge et à la frontière Thaïlande-Myanmar [81,167]. Plus particulièrement, une étude longitudinale réalisée à la frontière Ouest de la Thaïlande a décrit un pourcentage d'échantillons présentant des clairances parasitaires retardées évoluant de 0,6% en 2001 à 20% en 2010 [168].

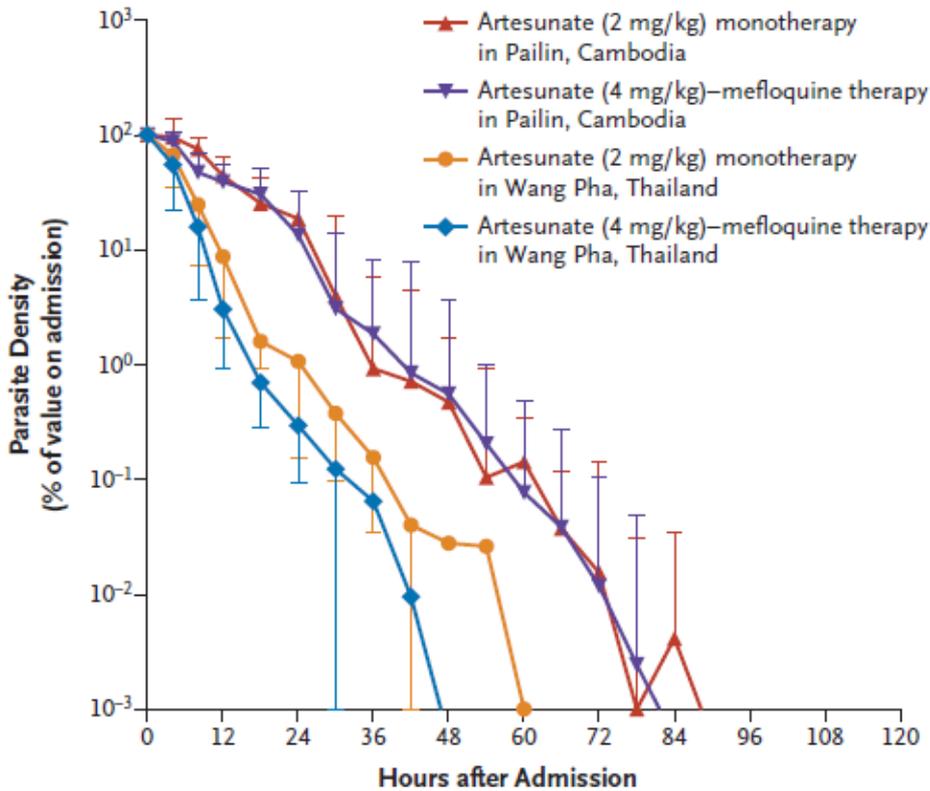


Figure 12: Courbes de clairance parasitaire (extrait de Dondorp et al., 2009)

La résistance aux dérivés de l'artémisinine a été maintenant détectée dans quatre pays de la sous-région du Grand Mékong : Cambodge, Myanmar, Thaïlande et Vietnam. La crainte actuelle est l'éventuelle propagation de la résistance de l'Asie du Sud-Est vers l'Afrique, comme cela a déjà été décrit pour la chloroquine et la SP dans les années 1970s à 1990s. Des efforts visant à endiguer la propagation de la résistance à l'artémisinine au niveau de la frontière Thaïlande-Cambodge ont été déployés depuis novembre 2008 avec le GPARC (Global Plan for Artemisinin Resistance Containment)[169].

Les études précédentes ont montré que la résistance aux dérivés de l'artémisinine est capable de se développer soit par sélection au cours d'une monothérapie soit par sélection après un traitement par CTA. La mise en évidence d'une baisse de sensibilité de souches de *P. falciparum* aux CTAs fait craindre la diffusion des résistances aux dernières stratégies thérapeutiques antipaludiques actuellement efficaces.

Il est donc essentiel de mettre en place des systèmes de surveillance efficaces pour détecter l'émergence et la diffusion de la résistance qui auraient un impact dramatique en terme de santé publique sur le contrôle du paludisme dans le monde [170].

1.2.7 Impact de la résistance en terme de santé publique

Dans les zones de faible transmission, où l'immunité des populations est faible voire absente, la résistance aux antipaludiques est rapidement visible à travers l'augmentation des échecs thérapeutiques. Elle participe aux épidémies de paludisme dans ces régions [171,172].

Dans les zones à forte transmission, l'impact de la résistance est difficilement quantifiable en raison d'une population très souvent immunisée. La résistance aux antipaludiques s'exprime par une parasitémie persistante et une augmentation du risque des formes sévères chez les patients faiblement immunisés. Les formes neurologiques du paludisme augmentent l'incidence des déficits neurologiques chroniques dans ces régions alors que l'anémie sévère augmente le risque de VIH chez les patients transfusés.

La résistance à la chloroquine a été fortement et pendant longtemps sous-estimée en Afrique, entraînant un usage prolongé de cette molécule dans de nombreux pays où la résistance était déjà installée. Les conséquences en santé publique ont été majeures. Une augmentation de la mortalité, surtout infantile, attribuable aux échecs thérapeutiques sous chloroquine, a été rapportée [173].

Le délai dans la réponse thérapeutique initiale et le retard de clairance des parasites augmentent le risque de portage des gamétocytes impliqués dans la transmission du paludisme et donc la recrudescence des infections [167]. L'augmentation de l'incidence des infections due à ces patients porteurs de gamétocytes, accroît le risque de transmission des parasites moins sensibles.

Enfin, l'impact économique de la résistance en zone endémique est majeur [174,175,176]. Les coûts directs de plusieurs lignes de traitement constituent un budget non négligeable pour les familles et les pouvoirs publics. On peut y ajouter les effets indirects constitués par la perte de revenus, de productivité ou l'absentéisme scolaire, associés à la maladie ou au décès prématuré.

1.3 La surveillance de l'efficacité des antipaludiques

1.3.1 Les systèmes de surveillance de la résistance en zone endémique

1.3.1.1 Quelles recommandations pour une surveillance efficace?

Afin de permettre un recueil de données précises, de qualité, et comparables pour la résistance aux traitements, l'OMS recommande une organisation coordonnée et planifiée par les ministères de la santé et les programmes nationaux de contrôle du paludisme. Ces derniers faciliteraient la surveillance uniforme, systématique et en temps réel de l'efficacité des molécules et la mise en place de sites sentinelles de surveillance de la résistance. Le bon fonctionnement de ces sites nécessite un personnel formé, des installations de laboratoire adaptées, des normes convenues pour la collecte des données, la réalisation d'analyses et la production des rapports de résultats selon les protocoles standards d'efficacité de l'OMS.

Cette surveillance peut impliquer soit des équipes au niveau national conduisant des études de terrain à travers le pays, soit des équipes à l'échelle des districts avec un support centralisé.

L'application des standards proposés par l'OMS est essentiel pour comparer les résultats des différentes études et permettre de guider les politiques nationales de traitement [177].

Ces standards impliquent que les études de surveillance soient réalisées sur une population de patients homogènes et similaires entre les sites, et en continu, aux mêmes périodes de transmission, au moins tous les deux ans pour évaluer les tendances. Les sites d'étude choisis doivent être répartis de façon homogène pour une bonne couverture du territoire national (l'étude sur 4 à 8 sites permet une représentativité suffisante et une faisabilité opérationnelle), avec des capacités logistiques importantes pour réduire les perdus de vue. Il est important de tester les premières mais aussi les deuxièmes lignes de traitement pour évaluer les stratégies thérapeutiques efficaces autres que les CTAs.

1.3.1.2 Un manque d'information concernant la résistance aux antipaludiques

Malgré un besoin pressant de surveiller l'efficacité des CTAs sur le continent africain, la surveillance systématique des nouveaux antipaludiques tend à diminuer en raison des nombreux défis qui sont apparus. Dans un premier temps, la question de la résistance aux

CTAs reste controversée. En dépit d'une baisse de sensibilité démontrée dans certaines régions d'Asie du Sud-Est, ces combinaisons resteraient à l'abri des résistances pour encore de nombreuses décennies [178]. Ensuite, les besoins techniques et logistiques nécessaires pour surveiller la résistance aux dérivés de l'artémisinine et aux molécules partenaires selon les standards de l'OMS sont devenus de plus en plus complexes. Le suivi des patients est passé de 14 jours en 1996 à 28 jours (voire 42 jours pour certaines combinaisons) en 2009. L'approche intégrée de l'évaluation de la résistance aux CTAs, incluant les méthodes de génotypage pour distinguer recrudescence et réinfection et les méthodes de pharmacologie, nécessite des capacités de recherche importante qui ne sont pas toujours disponibles au sein des programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Enfin, les contraintes financières liées à la surveillance de l'efficacité des antipaludiques sont de plus en plus élevées alors que parallèlement, les fonds destinés à cette surveillance et provenant des agences bi- et multilatérales sont de plus en plus réduits [179].

Les difficultés financières et logistiques accompagnant la réalisation d'une étude d'efficacité thérapeutique de terrain qui adhère aux standards de l'OMS, ont conduit à un manque d'information sur la résistance aux antipaludiques dans de nombreuses zones endémiques.

Seulement deux tiers des pays endémiques rapportant leurs données à l'OMS, conduisent une surveillance de la résistance selon les standards OMS [14]. Une majorité des données sont également inaccessibles, incomplètes ou difficilement comparables en raison de plusieurs biais rapportés ci-dessous:

- absence de standardisation dans le design des études et l'analyse des études ;
- données de faible qualité ;
- absence de mesures de dosage sanguin ;
- absence du génotypage différenciant la recrudescence de la réinfection ;
- suivi inapproprié des patients ;
- protocoles biaisés par des tailles d'échantillons inadaptées ;
- classement inexact des réponses thérapeutiques.

Face au défi crucial d'obtenir des données fiables d'efficacité, les structures gouvernementales et non gouvernementales se sont mobilisées pour faciliter et améliorer la surveillance de l'émergence de la résistance à l'échelle internationale.

1.3.1.3 La mise en place d'un réseau de surveillance internationale en zone endémique

L'OMS est un des principaux acteurs dans la surveillance de la résistance en zone endémique. Cette institution des Nations-Unies participe au contrôle du paludisme, à la mise en place de programmes de surveillance au niveau régional et national et facilite les études de terrain d'efficacité thérapeutique. Elle travaille en collaboration avec de nombreux acteurs de terrain et de nombreux réseaux régionaux de surveillance (**Tableau 8**).

Afrique	East African Network for Monitoring Antimalarial Resistance Network (EANMAT)	Burundi, Kenya, Ouganda, Rwanda, Tanzanie
	Horn of Africa Network for Monitoring Antimalarial Resistance Network (HANMAT)	Djibouti, Erythrée, Somalie, Ethiopie, Soudan, Yémen,
	Réseau d'Afrique Centrale pour le Traitement Antipaludique (RACTAP)	Angola, Cameroun, République Centrafricaine, Tchad, République du Congo, République Démocratique du Congo, Guinée équatoriale, Gabon
	Réseau d'Afrique de l'Ouest pour le Traitement Antipaludique I (RAOTAPI)	Cap-Vert, Guinée, Gambie, Guinée-Bissau, Mauritanie, Sénégal
	Réseau d'Afrique de l'Ouest pour le Traitement Antipaludique II (RAOTAPII)	Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Ghana, Niger, Nigéria, Sierra Léone, Togo
	Réseau de la Résistance aux Antipaludiques dans la Sous-Région Océan Indien (RERAOI)	Comores, Madagascar, Mayotte
	South East African Combination Anti-malarial Therapy (SEACAT)	Afrique du Sud, Mozambique, Swaziland
Asie du Sud-Est	Mekong Network	Cambodge, République Populaire de Chine, République Démocratique Populaire du Laos, Myanmar, Thaïlande, Viêtnam
Amérique du Sud	Red Amazoni ca para la Vigilancia de la Resistencia a las drogas Antimalaricas (RAVREDA)	Bolivie, Brésil, Colombie, Equateur, Guyane, Pérou, Suriname, Vénézuéla

Tableau 8: Réseaux régionaux de surveillance de l'efficacité des antipaludiques (adapté de Sibley et al., 2006)

Mais, motivé par les besoins des pays impaludés et guidé par un rationnel scientifique, un réseau global WWARN, s'est mis en place en coopération avec l'OMS et après l'approbation d'un groupe d'experts et de scientifiques répartis dans le monde entier. Face à l'urgence de la situation, son objectif était de rassembler l'ensemble des informations disponibles sur la

résistance en zone endémique et de développer des outils permettant à tous les acteurs du paludisme de collecter, analyser et partager leurs données d'efficacité thérapeutique.

Cette base de données internationales centralise de façon dynamique les données rétrospectives, voire prospectives de la réponse clinique, *in vitro*, moléculaire et pharmacologique, liée à la résistance aux antipaludiques de *P. falciparum* ou *P. vivax*. Ces données agrégées doivent permettre une surveillance des tendances spatiales et temporelles de la résistance, et appuyer les décideurs de santé publique par l'apport de preuves tangibles (Figure 13).

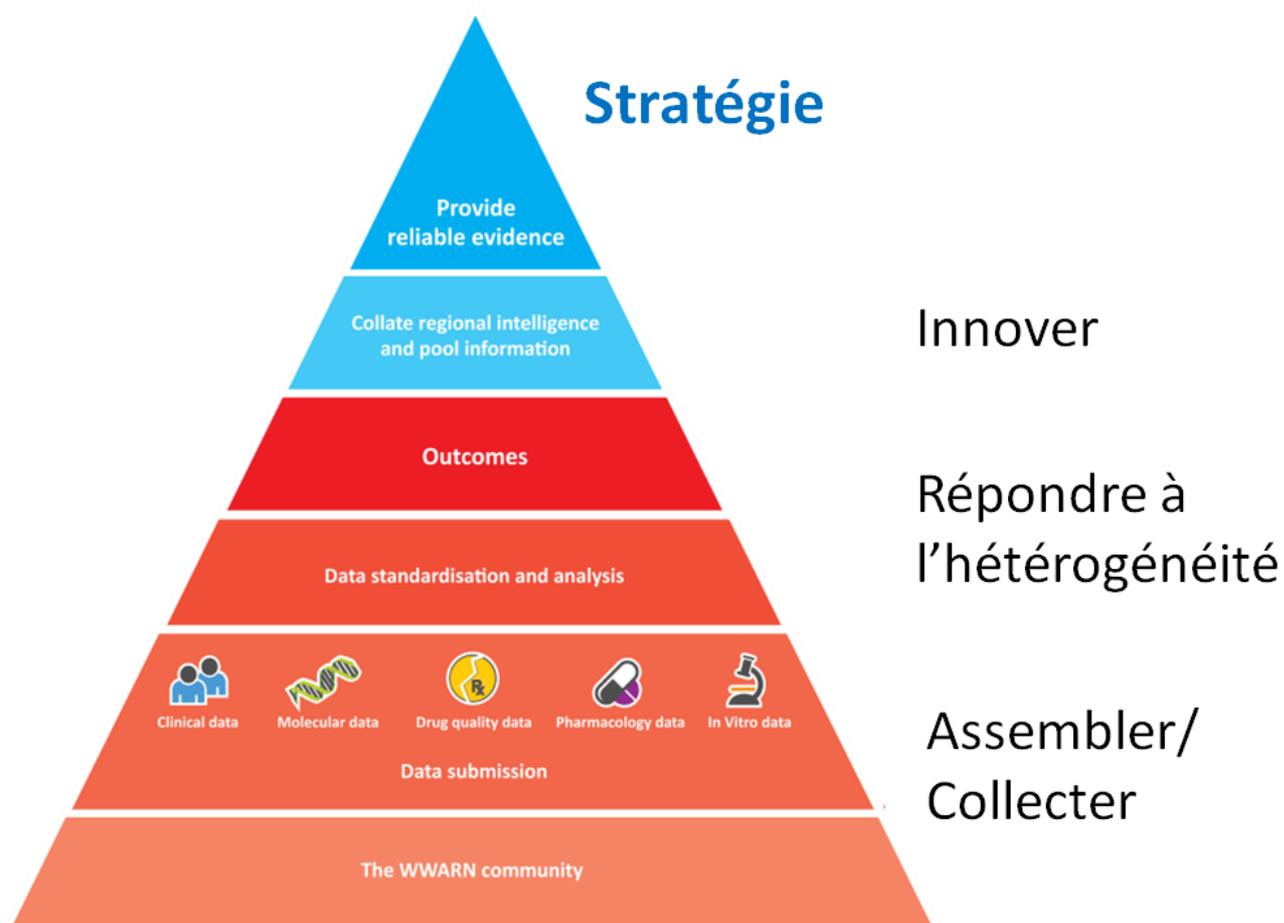


Figure 13: Stratégie développée par le réseau WWARN (<http://www.wwarn.org/>)

La centralisation des données permet d'intégrer et de rendre accessible l'information générée par de nombreux programmes de contrôle du paludisme et focalisée sur la surveillance de l'efficacité thérapeutique. Le Malaria in Pregnancy Consortium (MIP), l'Artemisinin Combination Therapy Consortium (ACT consortium), le réseau International Network for the Demographic Evaluation of Populations and Their Health in developing countries (INDEPTH), le Multilateral Initiative against Malaria network (MIM), les réseaux nationaux

et régionaux tels que le East African Network for Monitoring Antimalarial Treatment (EAN-MAT), sont tous des exemples de projets qui contribuent et bénéficient au réseau WWARN.

Grâce à la détection précoce d'échecs thérapeutiques, cette base de données permet de développer des investigations épidémiologiques et parasitologiques pour confirmer ou réfuter la résistance suspectée et ainsi argumenter et accélérer les changements de politique nationale. Elle sert également à informer sur l'utilisation optimale des antipaludiques et ainsi allonger la durée de vie des antipaludiques disponibles qu'ils soient dispensés en monothérapie ou en association.

Les limites qui persistent

Malgré la pertinence et les nombreux points forts du projet WWARN, certaines limites sont à noter.

En effet, le réseau WWARN n'est pas producteur de données et se trouve donc dépendant de la composante spatio-temporelle des études réalisées, ainsi que de la qualité des données rassemblées.

Les systèmes nationaux de veille sanitaire, qui fournissent les données brutes, sont eux-mêmes confrontés à des contraintes diverses, selon leur localisation géographique :

- Des sous-effectifs en personnel de santé ont été aggravés par les décisions politiques ayant suivi l'Initiative de Bamako. Cette résolution, votée en 1987 par les ministres de la santé africains réunis au Mali lors du 3ème Comité régional de l'OMS, a prôné le recouvrement des coûts et la participation communautaire. L'interprétation de cette initiative a poussé un grand nombre de gouvernements à se désengager de la participation financière publique aux soins de santé primaire, aboutissant parfois au choix des priorités sanitaires par les communautés elles-mêmes [180,181].
- Le niveau de formation des cadres de santé apparaît également comme une barrière à un système de surveillance efficace. La « fuite » des cadres formés vers des pays tiers, ainsi que la diminution notable des soutiens financiers aux structures de formation universitaires ou autres, en raison des nouvelles priorités des politiques de développement, expliquent en partie ce phénomène.
- Les problèmes d'infrastructures accentuent les difficultés rencontrées : difficultés de communication, pauvreté des infrastructures de laboratoires limitant les capacités de diagnostic et d'investigation de la résistance, problèmes répétés d'alimentation électrique ou d'alimentation en eau, etc.

Malgré l'engagement de l'OMS dans différents projets pour soutenir les systèmes de surveillance dans les pays dits « intermédiaires » ou en développement, de nombreuses faiblesses persistent, compliquant la mission du réseau WWARN.

Nous avons vu que l'évaluation des résistances est complexe sur le terrain. Elle nécessite des méthodes sophistiquées et une logistique importante. Les essais thérapeutiques présentent des méthodes peu standardisées entre eux et n'ont pas une vocation à la surveillance. La qualité des données est hétérogène. L'accès à l'information est souvent retardé en raison du délai de publication des résultats. Enfin, sur le terrain il est difficile de différencier un échec thérapeutique lié à une résistance et un échec lié à une variabilité individuelle (statut immunitaire ou pharmacologie).

Ainsi, dans la suite de ce document, nous souhaiterions investiguer la possibilité d'un système de surveillance de la résistance aux antipaludiques, qui soit complémentaire des réseaux déjà existants en zone endémique, et qui compense en partie les limites des études de terrain.

1.3.2 La surveillance des voyageurs comme solution ?

1.3.2.1 Les réseaux de surveillance des maladies infectieuses chez les voyageurs

De nombreuses initiatives internationales, régionales et nationales sont en place pour permettre la surveillance des maladies d'importation liées au voyage et faciliter la standardisation et le partage de l'information. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

A l'échelle internationale, le réseau GeoSentinel, initié en 1995 par l'International Society of Travel Medicine (ISTM) et par les Centers for Disease Control (CDCs), a exploré la possibilité d'utiliser la surveillance sanitaire des voyageurs comme système sentinelle de contrôle. Ce réseau, constitué de membres de l'ISTM et de cliniciens spécialisés dans la « médecine tropicale et des voyages », permet de détecter les tendances géographiques et temporelles des pathologies observées chez les voyageurs, les immigrants et les réfugiés. Il comprend un nombre limité de sites sentinelles, qui sont pour la plupart basés en Amérique du Nord [182,183]. Les informations collectées sont principalement utilisées pour relier les

diagnostics finaux des patients à des expositions géographiques identiques, et ainsi aider la prévention du risque lié au voyage [184].

A l'échelle européenne, devant la très grande hétérogénéité des systèmes de santé nationaux, une volonté et une nécessité de partage s'est concrétisée politiquement en 2005, par la création d'un centre européen de contrôle et de prévention des maladies (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC]), soutenu financièrement par la Commission Européenne [185,186].

Dans ce contexte, l'ISTM a mis en place le réseau EuroTravNet en 2008. Ce réseau européen collabore avec l'ECDC et contribue au réseau GeoSentinel à l'échelle internationale. Son objectif est de mettre en place, de maintenir et de renforcer un réseau multidisciplinaire d'experts, essentiellement des cliniciens de la médecine tropicale, qualifiés et ayant des compétences avérées dans la détection, l'identification et la gestion des infections importées.

Un réseau similaire de cliniciens existe déjà en Europe, TropNetEurop (European Imported Infectious Disease Surveillance) dont l'objectif principal est la surveillance des maladies infectieuses d'importation et la détection des infections émergentes au niveau régional, national ou international [187]. Les rapports de surveillance, normalisés et informatisés, sont réalisés par les sites participants. Une transmission immédiate des données anonymisées des patients vers une base de données centrale permet la détection en temps réel d'évènements sentinelles [188]. Pourtant, ce réseau ne regroupe pas une masse critique d'informations suffisantes pour générer une application opérationnelle et durable. De plus, il n'est pas lié directement à un système de surveillance institutionnel qui facilite la pérennité.

Malgré la multiplication de ces initiatives et le nombre croissant des réseaux de surveillance des pathologies infectieuses chez les voyageurs, aucun n'a la vocation de surveiller spécifiquement la résistance aux antipaludiques dans le paludisme d'importation à l'échelle internationale ou régionale. Seules des initiatives nationales sont actuellement en place.

1.3.2.2 Epidémiologie du paludisme d'importation

Le paludisme d'importation se définit comme les cas contractés en zone d'endémie et diagnostiqués dans un pays non endémique [189]. Au cours des dernières décennies, les flux de voyageurs internationaux n'ont cessé d'augmenter. Le nombre de touristes internationaux s'élevait à 1 milliard en 2010 (contre 664 millions en 2000). D'après la World Tourism

Organization (UNWTO), une augmentation de près de 50% est estimée pour 2020. Les raisons principales de voyage sont les vacances (50%), la visite à la famille et aux amis (27%) et enfin, le travail ou les affaires (12%). Le nombre de migrants à travers le monde a augmenté de 120 millions en 1990 à plus de 200 millions en 2006. Dans de nombreux pays, les immigrants constituent près de 20% de la population. La visite des amis ou de la famille ou « VFRs : Visit Friends and Relatives » est une composante majeure des voyages internationaux qui renvoie généralement à des immigrants originaires d'un pays en développement, vivant dans un pays industrialisé et retournant annuellement dans leur pays d'origine pour visiter amis et familles [190,191].

Les voyageurs sont souvent perçus comme une population sentinelle fournissant une information utile sur les infections à travers le monde, en particulier pour le paludisme [192]. Les flux migratoires entre les zones impaludées et les zones non endémiques se sont fortement accrus [193,194]. Chaque année, plus de 125 millions de voyageurs internationaux visitent au moins un des 109 pays impaludés dans le monde et près de 10 000 d'entre eux déclarent un paludisme à leur retour. Le nombre d'infections à *Plasmodium* rapportées chez les voyageurs est très certainement sous-estimé, en raison d'une sous-déclaration des cas au niveau des structures sanitaires des pays non endémiques. Il s'élèverait à plus de 30 000 cas par an. Le risque de développer une forme symptomatique du paludisme est élevé chez les voyageurs et les immigrants de retour dans leur pays d'origine, en raison de l'absence ou de la faible immunité antipaludique protectrice dans cette population [190].

Pour plusieurs raisons, le paludisme d'importation est actuellement considéré comme un problème important de santé publique dans les pays ayant éradiqué avec succès cette maladie:

- Au niveau individuel, de nombreux cas restent mal ou non diagnostiqués, induisant un taux de mortalité non négligeable (en France, le taux de mortalité des cas importés de paludisme s'élève à près de 4,4/1 000 cas [195]) ;
- Au niveau collectif, les individus infectés de retour en zone non endémique et « réservoirs humains » du parasite, pourraient favoriser la réémergence de la transmission autochtone du paludisme. D'ailleurs en 2006, un cas de paludisme autochtone à *Plasmodium vivax* a été détecté en Corse ; le premier cas depuis 1972. La présence du vecteur du paludisme actif associée à des conditions environnementales favorables est néanmoins nécessaire. Jusqu'ici, aucune chaîne de transmission pérenne du paludisme ne semble s'être installée dans l'île [196]. A l'opposé, la situation de la

Grèce, en proie à une épidémie locale d'infections à *P. vivax* ayant débuté en 2009 dans la préfecture de Lakonia et s'étant étendue à quatre autres préfectures grecques ainsi qu'à la Roumanie en 2011, a laissé suggérer la persistance d'une transmission autochtone [197,198,199]. Cette situation ne s'était pas vue depuis les années 50s.

En Europe, depuis le début des années 1970, le nombre rapporté de cas importés a été multiplié par dix, passant de près de 1 500 en 1972 à plus de 15 000 en 2000, puis a largement diminué au cours des dix dernières années, s'estimant à près de 6 000 en 2010 (**Figure 14**) [200]. La France et le Royaume-Uni sont les deux pays d'Europe enregistrant le plus grand nombre de cas importés (~70% des cas en Europe). Cependant, le nombre de cas rapporté au niveau européen est probablement largement sous-estimé. Premièrement au niveau national, les cas de paludisme ne sont pas toujours à déclaration obligatoire. Le nombre de cas estimé dans chaque pays est donc fortement lié à la fiabilité du réseau sentinelle mis en place. Faiblement exposés à cette pathologie tropicale, les médecins généralistes peuvent avoir des difficultés à en faire le diagnostic. Deuxièmement au niveau européen, les données CISID (Centralized Information System for Infectious Diseases) de l'OMS sont peu informatives. En effet, ces données sont transmises par chaque pays de façon indépendante, sans standardisation ni harmonisation. Il se peut d'ailleurs que les pays omettent parfois de les transmettre. Enfin, il existe un manque de concertation entre l'envoi de données estimées ou de données rapportées, favorisant la confusion.

Aux Etats-Unis, le nombre de cas importés confirmés et rapportés aux CDCs est d'environ 1 500 par an, avec une baisse significative de 14% en 2008 (soit 1 300 cas rapportés), parmi lesquels près de 70% sont en provenance d'Afrique et près de 21% en provenance d'Asie. *P. falciparum* et *P. vivax* constituent la majorité des infections à *Plasmodium* et ont été identifiés respectivement dans 69% et 25% des patients infectés (**Figure 15**) [201].

Malaria - Imported malaria cases
Number of class breaks (percentiles)

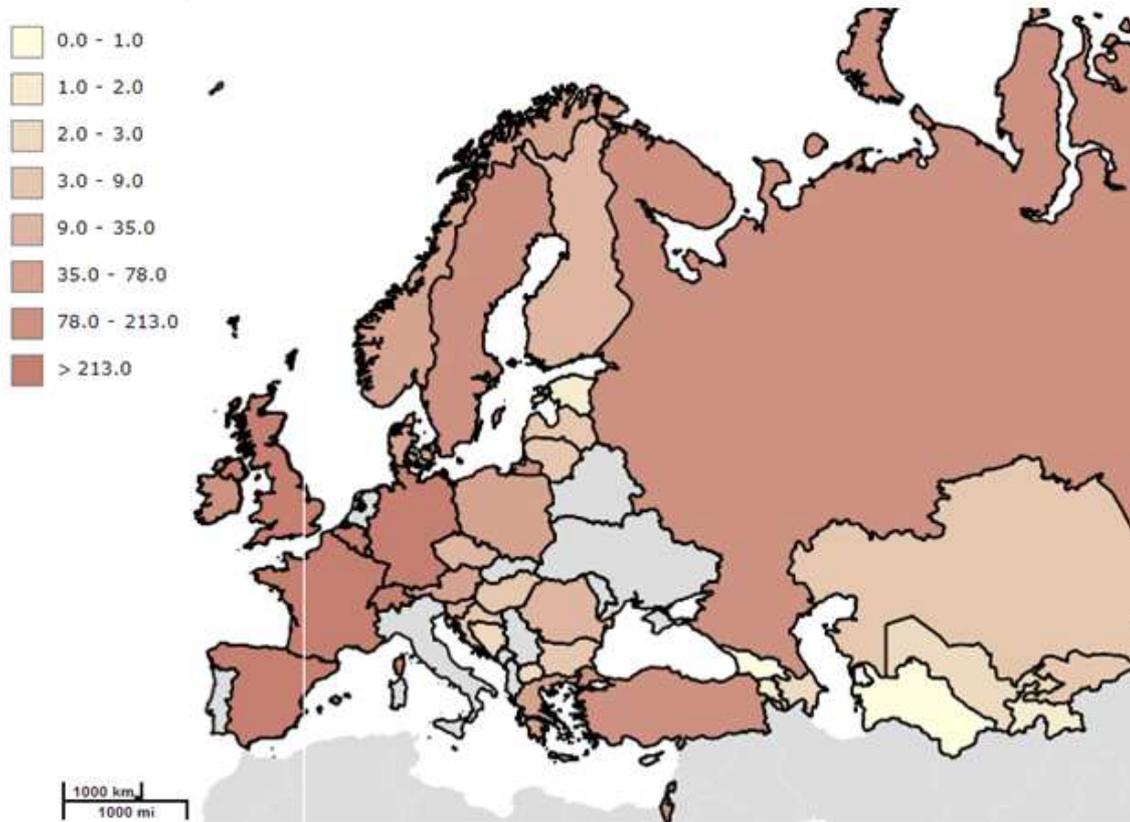


Figure 14: Nombre de cas importés en Europe en 2010 (extrait de l’OMS - Bureau Régional Europe, CISID <http://data.euro.who.int/cisid/?TabID=233665>)

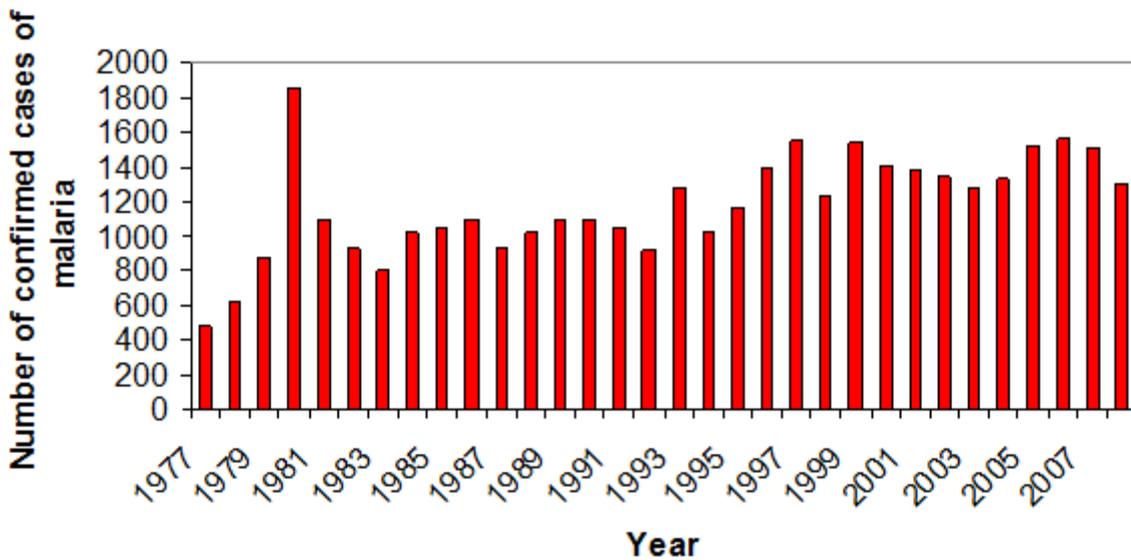


Figure 15: Cas confirmés de paludisme de 1977 à 2008 aux Etats-Unis (adapté du MMWR report 2010, CDC)

Au Canada, le système de surveillance des maladies infectieuses notifie en moyenne près de 500 cas et un décès par an. Ce système s'est renforcé début des années 90s par la décentralisation vers les Provinces et les Territoires. Dans la Province du Québec de 1981 à 2002, la majorité des patients a été infectés en Afrique subsaharienne (65%) et en Asie du Sud (23%) par *P. falciparum* dans 52% des cas (**Figure 16**) [202].

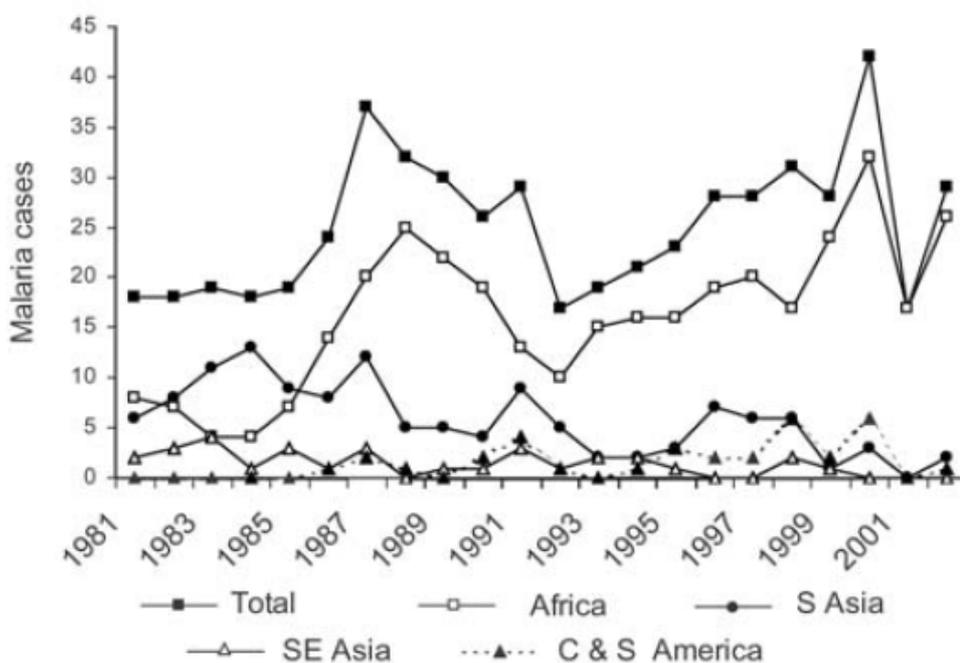


Figure 16: Cas rapportés de paludisme de 1981 à 2002 au centre de référence du paludisme à Montréal, Canada (the McGill University Centre for Tropical Diseases) (extrait de MacLean et al., 2004).

2 - POSITION DU PROBLEME

2.1 Rationnel

La résistance à la majeure partie des traitements antipaludiques actuellement disponibles, ainsi que l'émergence de la résistance aux derniers traitements efficaces que sont les CTAs, se révèlent comme des facteurs d'échec pour le contrôle de cette pathologie dans le monde [203].

Les conséquences de la résistance aux antipaludiques se retrouvent à plusieurs niveaux. Celle-ci participe à une augmentation des échecs thérapeutiques précoces et de la récurrence des accès palustres, ainsi qu'à une hausse de la morbi-mortalité. Les risques d'anémie dans les populations exposées, et de transmission sont accrus. Enfin, l'augmentation des dépenses de santé est une conséquence indirecte, qui a toute son importance dans des régions déjà touchées par la pauvreté [204,205].

Or, l'évaluation de la résistance est complexe. Elle s'appuie essentiellement sur la réponse clinique au traitement, souvent biaisée par de nombreux facteurs qui sont, soit liés au parasite tels que les réinfections ; soit liés à l'hôte tels que l'immunité, l'observance ou la pharmacodynamique de l'individu. L'évaluation moléculaire et *in vitro* de la résistance nécessitent des structures et des outils adaptés qui sont parfois difficiles à mettre en place en zone endémique. Un manque de standardisation entre les méthodes complique la comparaison des résultats entre les structures de recherche.

Enfin, l'information actuelle sur la répartition des résistances dans le monde manque cruellement de données. Celles-ci proviennent principalement des études d'efficacité thérapeutique de terrain présentant de nombreuses limites telles que :

- une logistique difficile des études de terrain et donc une absence d'information disponible pour certaines zones;
- un accès retardé à l'information, en raison du délai de publication;
- une standardisation limitée des méthodes;
- le nombre limité de structures se conformant aux standards de l'OMS pour évaluer la résistance;
- une absence de centralisation de l'information;
- une hétérogénéité dans la qualité des données.

2.2 Hypothèse

La surveillance des voyageurs infectés de retour de zones endémiques est une source d'informations riche et pertinente pour détecter l'émergence et suivre l'évolution des résistances aux antipaludiques :

- L'absence ou la faible immunité acquise vis-à-vis du paludisme permet de mieux évaluer l'efficacité thérapeutique et de détecter l'évènement rare qu'est l'émergence d'une résistance.
- L'absence ou la faible probabilité de réinfection permet d'attribuer une parasitémie persistante après traitement à un vrai échec thérapeutique.
- Les méthodes sont standardisées pour la collecte des données permettant l'obtention de données homogènes et de qualité.
- Les systèmes de surveillance des voyageurs, déjà bien en place dans certains pays non endémiques, permettent une collecte des données en continu et en temps réel.
- La surveillance des voyageurs permet de couvrir des zones endémiques et des périodes où apparaît un manque d'information dû à l'absence d'études publiées ou à l'absence de données de qualité.
- La surveillance de la résistance chez les voyageurs utilise des outils biologiques performants et sophistiqués. Les données des patients peuvent être complètes et transversales par la présence de données épidémiologiques, cliniques, pharmacologiques, d'analyses moléculaires ou de phénotypage *in vitro*.
- L'ensemble de ces données permettent d'évaluer l'efficacité thérapeutique des médicaments en circulation en zone endémique et non endémique.

2.3 Objectif

Ainsi, l'objectif auquel nous souhaiterions répondre, est de savoir si la surveillance du paludisme d'importation en zone non endémique pourrait être utilisée comme outil de détection de l'émergence de la résistance et du suivi des tendances dans les pays endémiques d'où sont issus les cas.

Dans un premier article, nous avons voulu vérifier si la surveillance des voyageurs pouvait être un bon indicateur de l'émergence et des évolutions de la résistance sur le terrain. Nous avons pour cela analysé les données longitudinales des voyageurs de retour de quatre pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale, infectés par *P. falciparum* et diagnostiqués en France, sur une période de dix ans. Les tendances de la résistance chez les voyageurs ont été comparées à celles observées sur le terrain, publiées ou non dans la littérature.

L'analyse temporelle des données de résistance a été réalisée pour la chloroquine et la SP, qui sont des molécules largement étudiées sur le terrain et chez les voyageurs depuis les années 2000s, permettant un recul et un nombre de données suffisantes. L'identification de marqueurs de résistance bien définis pour ces molécules a permis une évaluation moléculaire de la résistance. L'évaluation de la susceptibilité *in vitro* pour la chloroquine a été réalisée pour valider et confirmer les résultats moléculaires.

Dans un deuxième article, nous avons souhaité mettre en application la surveillance de la résistance chez les voyageurs dans la détection de l'émergence de la résistance. Nous nous sommes intéressés à l'apparition de résistance à la chloroquine suite au terrible séisme survenu en Haïti en 2010. Des échantillons provenant de voyageurs infectés et de retour en France ou au Canada ont été analysés sur le plan moléculaire et pour la susceptibilité *in vitro*.

Enfin, dans un troisième et quatrième article, nous avons souhaité étudier une deuxième application de la surveillance des voyageurs : la détection des changements de profil de la résistance en fonction des modifications de pression médicamenteuse.

Le troisième article s'est intéressé aux modifications de la consommation de la chloroquine sur une période de dix ans, chez les enfants africains de moins de cinq ans présentant de la fièvre. Les données ont été rassemblées à partir des bases de données de Demographic Health Survey (DHS) et des enquêtes à indicateurs multiples (MICS). Une analyse complexe utilisant

les modèles mixtes a permis d'estimer les consommations de chloroquine au cours du temps dans différents pays africains.

Le quatrième article s'est, quant à lui, ciblé sur les évolutions de la résistance à la chloroquine chez les voyageurs de retour de zones impaludées de 2000 à 2011, suite aux évolutions de la consommation de ce médicament estimées dans l'article 3.

Dans la suite de ce manuscrit, les résultats des études décrites précédemment sont présentés sous forme d'articles publiés ou en cours de publication. Chacun d'eux est précédé de la problématique et d'un résumé des principaux résultats en langue française. Dans un dernier temps, sous forme de discussion, nous avons proposé des perspectives de réflexion pour améliorer la surveillance de la résistance à l'échelle internationale et plus généralement les stratégies de prévention de l'émergence ou de la diffusion des résistances en zone endémique.

3 - POPULATION ET METHODES

3.1 Organisation du système de surveillance national du paludisme d'importation en France

En France, l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) a participé au financement et à la création du Centre National de Référence du paludisme (CNR Palu) afin de répondre à ses obligations vis-à-vis du Ministère de la Santé, qui sont la surveillance, la vigilance et les alertes dans tous les domaines de la Santé Publique. Le CNR Palu regroupe, depuis 2006, deux entités : le CNR de l'Epidémiologie du Paludisme d'Importation et Autochtone (CNREPIA) (avant 2002 CNR des Maladies d'Importation, CNRMI) et le CNR de la Chimiosensibilité du Paludisme (CNRCP), qui sont actifs depuis 1984.

Ses missions sont nombreuses et consistent essentiellement à :

- assurer la surveillance épidémiologique du paludisme d'importation, voire l'investigation des cas autochtones (contractés en France métropolitaine), et d'évaluer la chimiosensibilité des isolats de *P. falciparum* importés ;
- assurer l'alerte de situations inhabituelles ou nouvelles sur le plan épidémiologique ou biologique ;
- participer à l'expertise de nouveaux dispositifs médicaux de diagnostic et d'investigation du paludisme ;
- conseiller les autorités sanitaires sur les mesures de prévention et de traitement du paludisme d'importation ;
- participer à la mise en place d'études épidémiologiques sur les facteurs de morbidité et de mortalité.

En 2006-2011, trois organismes sont impliqués dans les missions du CNR Palu: l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), l'Université Pierre et Marie Curie Paris 6 et l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA) à Marseille².

Trois laboratoires de parasitologie, basés à Paris et Marseille, assurent conjointement les investigations biologiques et épidémiologiques. Ce système de surveillance national est un réseau sentinelle constitué de 79 correspondants volontaires associant des cliniciens et des biologistes. La couverture nationale et la représentativité du réseau sont étendues mais hétérogènes ; puisqu'en 2010, seuls 75% des correspondants ont transmis de façon régulière plus de 50% des cas déclarés. Le paludisme autochtone constitue, quant à lui, une maladie à

² En 2012 s'est ajouté l'Institut Pasteur de Guyane, département français où le paludisme forestier est endémique, l'IMTSSA devenu IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées) étant en charge de l'investigation pour Mayotte, le second département où le paludisme est endémique.

déclaration obligatoire. Pour chaque hôpital, la prise en charge des cas de paludisme puis la saisie électronique des données démographiques, épidémiologiques, cliniques, thérapeutiques et biologiques sont assurées par un duo référent de praticiens hospitaliers composé d'un clinicien et d'un biologiste. Un cahier d'observation est renseigné et les isolats sanguins sont envoyés par coursier express à l'un des trois laboratoires référents du CNR Palu pour la confirmation du diagnostic et la réalisation d'analyses spécialisées (PCR diagnostiques, antipaludogrammes, marqueurs moléculaires, dosages de médicaments).

Les données sont collectées de façon exhaustive et en temps réel à l'aide d'un cahier d'observation de saisie en ligne sécurisée (<https://ssl.voozano.net/palu/>) (Figure 17).

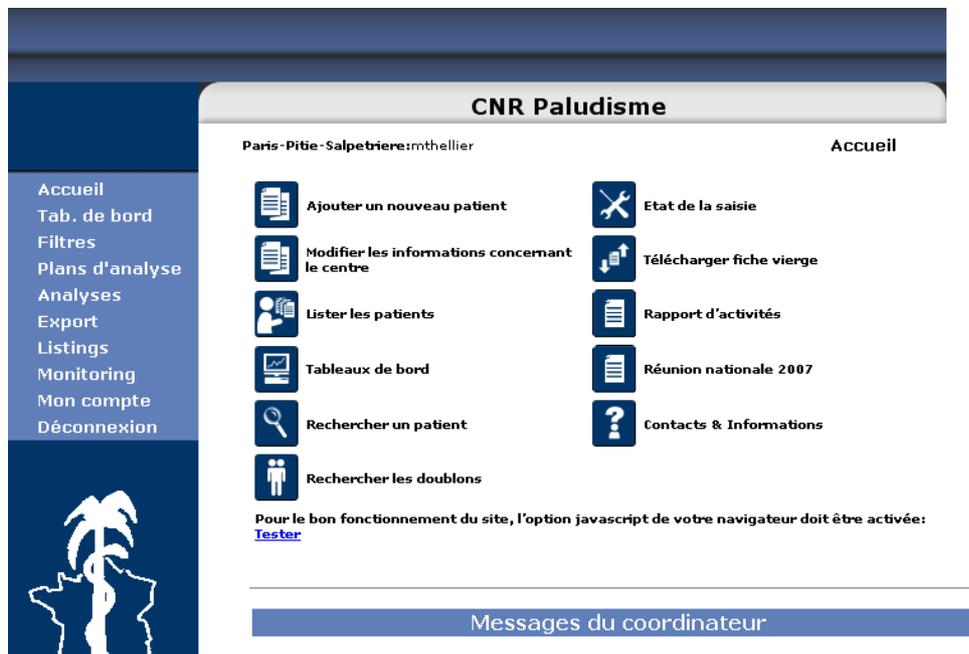


Figure 17: Page d'accueil du site regroupant les cahiers d'observation du CNR Palu

Un rapport annuel des tendances et des alertes détectées (cas groupés, émergences d'un pays contaminateur ou d'une chimiorésistance, modifications de la saisonnalité, etc.) sont transmis annuellement à l'InVS. Les faits d'importance sont communiqués sans délai à la communauté médicale par le canal du Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire ou des revues Eurosurveillance et Travel Medicine and Infectious Disease [196].

Une réunion annuelle d'information et de compte-rendu de l'activité du CNR Palu, regroupe l'ensemble des correspondants, ainsi que la tutelle, pour dresser le bilan d'activité et envisager des améliorations de fonctionnement du système (**Figure 18**).

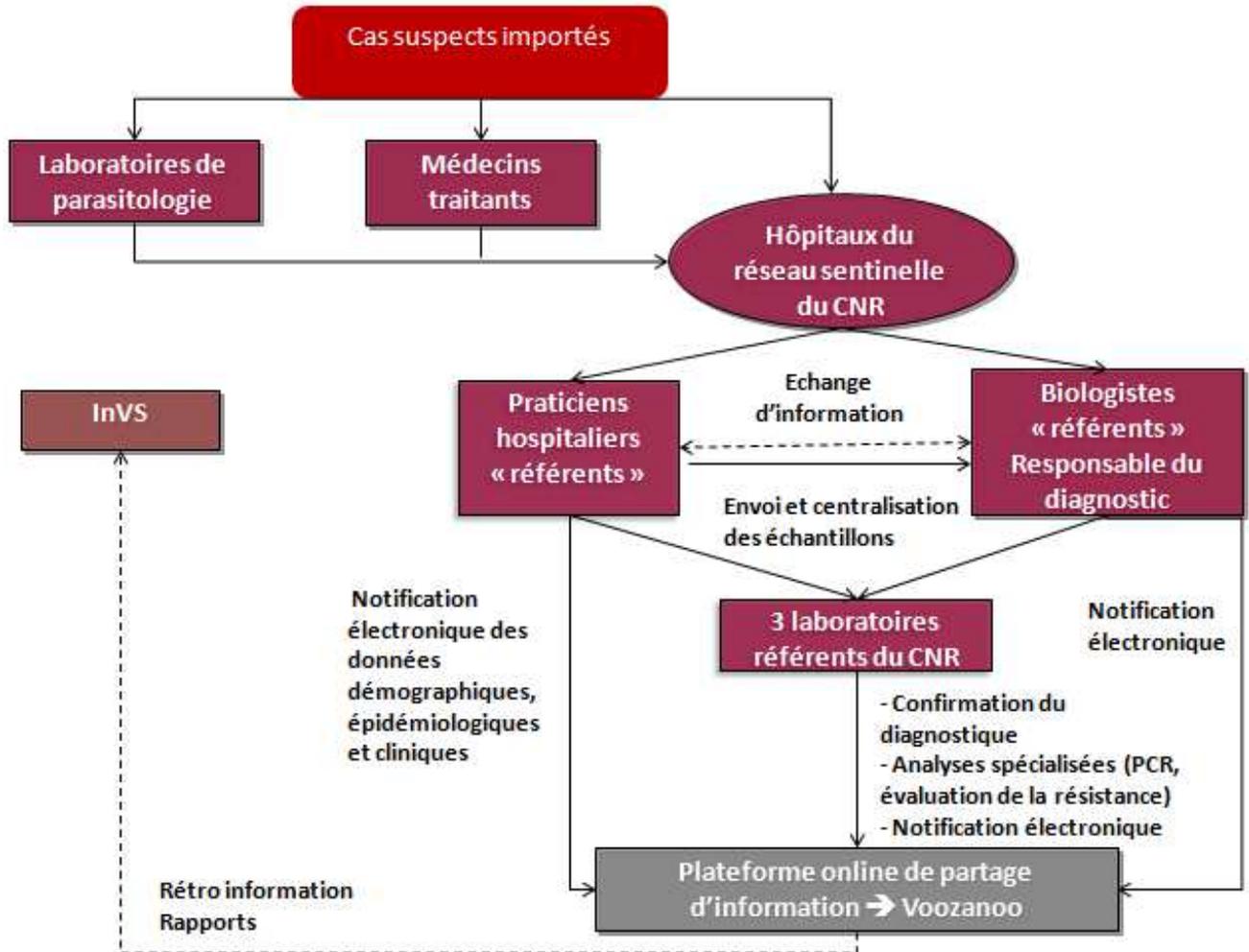


Figure 18: Schéma des voies de notification du système de surveillance national du paludisme importé en France

3.2 Données épidémiologiques du paludisme d'importation en France

Le nombre de cas de paludisme d'importation a été en forte hausse jusqu'à l'année 2000, atteignant un pic de 4 200 cas notifiés (8 000 cas estimés) en France (hors Guyane et Mayotte, zones endémiques). Puis, une décroissance régulière a été observée au cours des dix dernières années, qui contraste avec le nombre croissant des voyageurs en zones impaludées depuis les années 80s (**Figure 19**). Les facteurs tels que la baisse globale de l'incidence du paludisme dans le monde, une meilleure adhérence aux recommandations de prophylaxie, la mise sur le marché de l'association atovaquone+proguanil (suite à l'extension de la résistance à la chloroquine ou au proguanil seul et suite à la notification de nombreux cas d'intolérance à la méfloquine), ou la baisse du nombre de voyageurs dans l'un des quatre pays africains les plus représentés dans le paludisme d'importation (Côte d'Ivoire, Mali, Cameroun ou Sénégal) peuvent expliquer en partie ce phénomène. En 2010, 2 438 cas ont été déclarés au CNR Palu par le réseau d'hospitaliers répartis sur le territoire, permettant d'estimer à près de 4 600 le nombre total de cas de paludisme. Une augmentation de 10% par rapport à 2009 contraste avec la baisse du nombre de voyageurs en zone d'endémie depuis cette date. Une saisonnalité est observée avec un pic de fréquence entre juillet et septembre, qui correspond à la période estivale où les voyages en zone impaludée augmentent (**Figure 20**). Plus de 90% des cas de paludisme, en majorité à *P. falciparum* (86% des infections), ont été contractés en Afrique sub-saharienne. Les sujets d'origine africaine résidant en France, ou arrivant d'Afrique, ont été plus à risque de contracter un paludisme (74% des infections), en raison des coûts élevés des chimioprophylaxies actuelles et d'un probable manque d'information sur les mesures de prévention nécessaires ou sur les risques de paludisme grave. L'évolution vers une forme sévère est non négligeable puisqu'elle atteint 7,6% des cas, avec une létalité de 0,33% sur l'ensemble des cas déclarés et de 4,42% sur les formes graves [148,206].

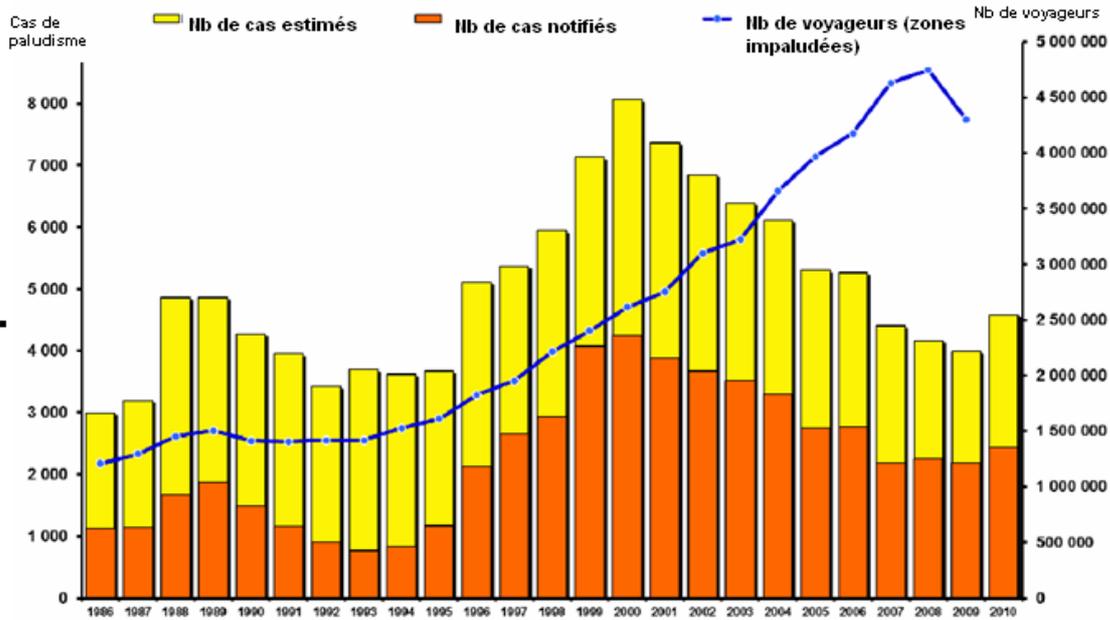


Figure 19: Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés et cas estimés et évolution du nombre de voyageurs vers les zones impaludées, en France métropolitaine de 1986 à 2010 (Extrait du rapport du CNR Palu, 2010)

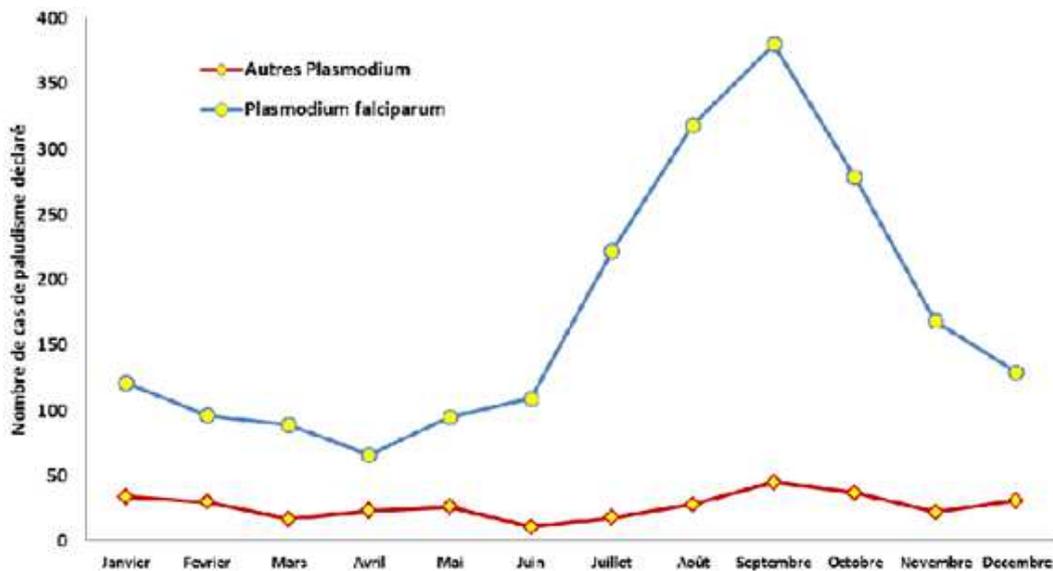


Figure 20: Paludisme d'importation en 2010 : distribution mensuelle des cas (n=2439) (Extrait du rapport du CNR, 2010)

3.3 Mise en place de collaborations pour un réseau international de la surveillance du paludisme d'importation

3.3.1 Paludisme d'importation au Royaume-Uni

Dans le cadre de cette thèse, un long processus de collaborations a été initié pour permettre la mise en place d'un réseau international de la surveillance du paludisme d'importation. Le Royaume-Uni, deuxième pays européen après la France à présenter un nombre considérable de cas de paludisme suite à un séjour en zone endémique, est un partenaire clef pour la réalisation de ce projet. Un partenariat avec le Malaria Reference Laboratory au sein de l'Hospital for Tropical Diseases au Royaume-Uni (Pr P Chiodini, Dr C Sutherland et Dr R Behrens) est donc en cours de réalisation.

Les cas de paludisme, à déclaration obligatoire au Royaume-Uni, sont rapportés au Malaria Reference Laboratory. Le nombre annuel d'infections à *plasmodium* est en légère baisse depuis plus de 10 ans, évoluant de près de 2 100 cas en 2000 à 1 750 en 2006, pour atteindre 1 500 cas en 2010 (**Figure 21**). Les pays de contamination sont principalement l'Afrique (72%) et l'Asie du Sud (25%). La proportion du nombre d'infections imputables à *P. falciparum* par rapport à *P. vivax* a été en forte augmentation ces dernières années, passant de 1,3 pour 1 en 1987-90 à 5,4 pour 1 en 2002-06. Le taux de mortalité, estimé à 7,4 décès pour 1 000 cas rapportés, est resté constant au cours du temps. Enfin, l'adhésion à une chimioprophylaxie est plus faible chez les personnes retournant dans leur pays d'origine pour visiter les amis et la famille que chez les autres voyageurs (utilisation d'une chimioprophylaxie OR (Odd Ratio) = 0,23 IC95% [0,21-0,25]) [207]. Comme en France, une dissociation des voyages et des cas est observable à partir de 2001.

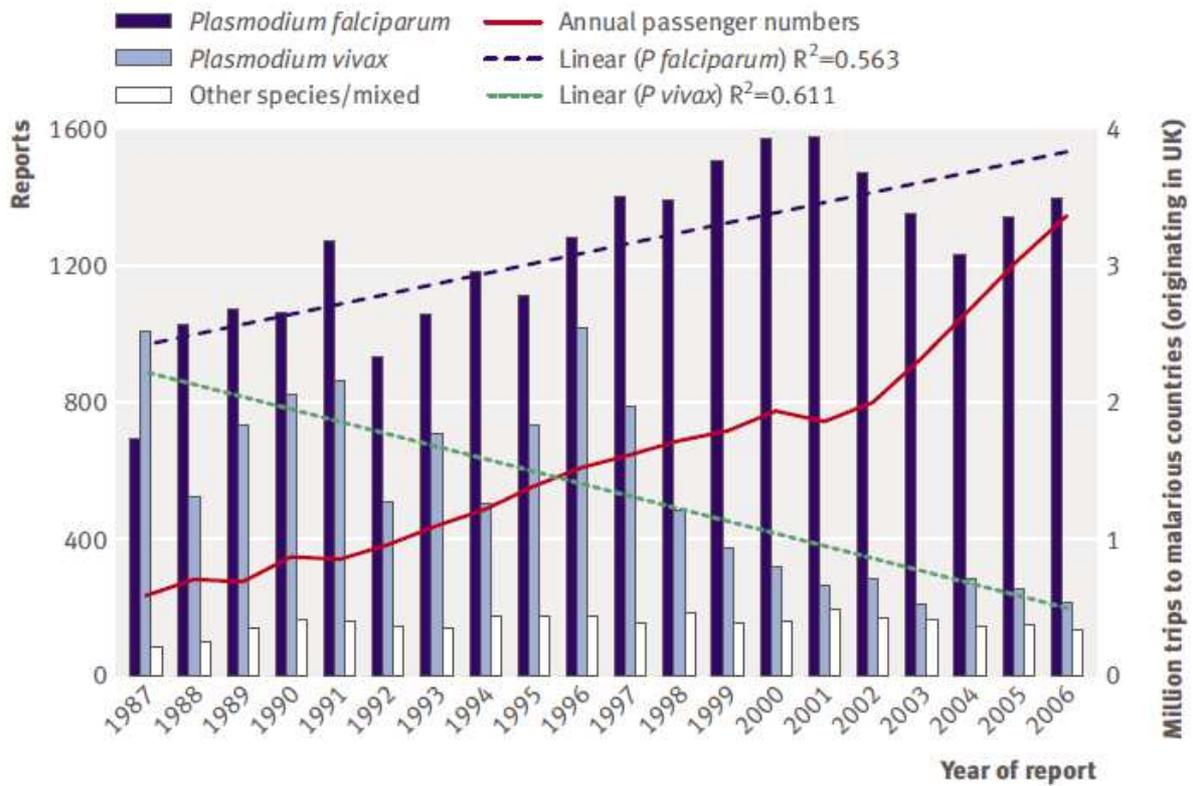


Figure 21: Cas rapportés de paludisme et évolution du nombre de voyageurs vers les zones impaludées de 1987 à 2006 au Royaume-Uni (Extrait de Smith et al., 2008)

3.3.2 Autres partenaires approchés

Afin d'étendre les régions endémiques couvertes par les voyageurs, des partenariats avec les CDCs aux Etats-Unis, l'Ontario Agency for Health Protection and Promotion et la Research Chair in Molecular Parasitology au Canada, ont été initiés, voire finalisés.

D'autres partenaires européens ont été approchés au cours de cette étude, en particulier l'ECDC et les réseaux EuroTravNet et TropNetEurop.

3.4 Les données rassemblées pour cette étude

3.4.1 Pour les cas importés

Les données ont été extraites, standardisées et mises en communs de façon rétrospective sur la période 1996-2011, à partir de la base de données de surveillance du paludisme d'importation en France. Le critère d'inclusion retenu pour cette étude est tout voyageur ayant visité une zone endémique dans les deux mois précédant le diagnostic et présentant une infection à *P. falciparum* confirmée biologiquement par goutte épaisse et frottis sanguin. Les données collectées concernent :

- les données épidémiologiques et démographiques des cas importés de paludisme ;
- les données cliniques : début des signes cliniques, espèce plasmodiale, parasitémie, critères de gravité [6];
- les données d'efficacité thérapeutique : chimioprophylaxie, la prise en charge du patient, le traitement prescrit, la posologie, les échecs thérapeutiques (fièvre et parasitémie à Jour 0, 3, 7 et 28), les concentrations sanguines d'antipaludiques à Jour 0 et 7 ;
- les données moléculaires de résistance à certaines molécules à Jour 0 et Jour échec, analysés sur des échantillons de sang prélevés sur papier filtre et/ou analysés après l'extraction d'ADN sur échantillon de sang veineux ;
- les données de chimiorésistance *in vitro* à Jour 0 et Jour échec, à partir des échantillons de sang cryoconservés.

3.4.2 Pour les données de terrain

Les données de résistance aux antipaludiques dans les pays endémiques d'où proviennent les cas importés, ont été récupérées à partir :

- de la littérature publiée dans des revues scientifiques à comité de lecture international ou dans des rapports en langue anglaise et française ;
- d'études non publiées, obtenues grâce aux collaborations mises en place au sein du réseau WWARN.

4 - LA RESISTANCE CHEZ LES
VOYAGEURS EST - ELLE
REPRESENTATIVE DE CELLE
OBSERVÉE SUR LE TERRAIN?
(ARTICLE 1)

Gharbi M, Flegg J, Pradines B, Berenger A, Ndiaye M, Djimdé A, Roper C, Hubert V, Kendjo E, Legros F, Venkatesan M, Brasseur P, Gaye O, Touré Offianan A, Penali L, Le Bras J, Guerin PJ, Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study. Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug resistance in endemic countries. Soumis en Mars 2013 à Plos One.

4.1 Problématique de l'article 1

Ce travail est le résultat d'une importante collaboration, facilitée par le réseau WWARN, entre le système national de surveillance du paludisme d'importation, le CNR Palu France et de nombreux laboratoires de recherche sur le paludisme en zone d'endémie.

Avant d'envisager la surveillance des voyageurs comme outil additionnel de détection ou de suivi de l'évolution des résistances aux antipaludiques, il était essentiel de tester, dans un premier temps, l'hypothèse que les profils de résistance observés chez les cas importés étaient représentatifs de ceux observés sur le terrain.

Les données de surveillance du CNR Palu ont été rassemblées sur la période 1996-2011, avant d'être comparées aux données de la littérature et à des données non publiées, évaluant les profils de résistance en zone endémique. Pour valider ce concept, nous avons choisi de travailler sur quatre pays d'Afrique différents, couvrant une même période d'étude. Et nous avons choisi d'évaluer la résistance de deux molécules différentes, la chloroquine et la pyriméthamine, à travers des méthodes moléculaires et des tests de susceptibilité *in vitro*. Cette étude, en validant notre hypothèse définie ci-dessus, nous permettra par la suite de mettre en application l'utilisation de la surveillance des voyageurs dans la détection et le suivi des tendances de la résistance en zone endémique.

4.2 Résumé des principaux résultats

Les isolats des patients symptomatiques, présentant une infection à *Plasmodium falciparum*, de retour de quatre pays endémiques : le Mali, le Cameroun, la Côte d'Ivoire ou le Sénégal, ont été analysés sur la période 1996-2011. La susceptibilité des parasites aux antipaludiques a été comparée à la susceptibilité des parasites observée sur le terrain pour ces quatre pays, à cette même période.

L'évolution des proportions des parasites mutants pour le gène *Pfcr76*, marqueur de résistance de la chloroquine, et pour le gène *Pfdhfr*, marqueur de résistance de la pyriméthamine, a été comparée entre les données des voyageurs et celles de terrain. Les pentes des modèles de régression logistique ont permis cette comparaison. La réponse de susceptibilité *in vitro* à la chloroquine a également été comparée entre les isolats des voyageurs et ceux de terrain pour le Sénégal, à l'aide d'un modèle linéaire généralisé.

Les tendances dans le temps des proportions des parasites porteurs des mutations *Pfcr76T*, et *pfdhfr108N*, n'ont pas montré de différence significative entre les profils de résistance des voyageurs et ceux observés sur le terrain, pour les quatre pays ciblés. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse *in vitro* de susceptibilité des parasites à la chloroquine. Là aussi, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre l'évolution des proportions des parasites résistants chez les voyageurs et celle observée sur le terrain au Sénégal.

D'une manière générale, ce travail souligne la pertinence d'une utilisation de la surveillance des voyageurs comme système additionnel de détection et de suivi de la résistance en zone endémie, particulièrement dans les zones où l'information est peu disponible.

PLOS ONE

Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug resistance in endemic countries --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug resistance in endemic countries
Short Title:	Surveillance of travellers for tracking resistance
Corresponding Author:	Myriam Gharbi, PharmD, MPH IRD et PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie Paris, FRANCE
Keywords:	Plasmodium falciparum; Malaria; antimalarial drug resistance; chloroquine; pfcr76; pfdhfr108; molecular markers; in vitro response; surveillance; travellers; artemisinin-based combination therapies
Abstract:	<p>Introduction There are growing concerns about the emergence of resistance to artemisinin-based combination therapies (ACTs). Since the widespread adoption of ACTs, there has been a decrease in the systematic surveillance of antimalarial drug resistance in many malaria-endemic countries. In addition, high levels of host immunity in malaria-endemic countries complicate the identification of treatment failures associated with resistance. The aim of this work was to test whether data on travellers returning from Africa with malaria could serve as an additional surveillance system for the emergence of drug resistance in endemic-countries.</p> <p>Methodology Data were collected from travellers with symptomatic Plasmodium falciparum malaria returning from Senegal, Mali, Cote d'Ivoire or Cameroon and recorded in the French Malaria Reference Centre during the period 1996-2011. Temporal trends of the proportion of parasite isolates that carried the mutant genotype, pfcr 76T, a marker of resistance to chloroquine (CQ) and pfdhfr 108N, a marker of resistance to pyrimethamine, were compared for travellers and within-country surveys. The in vitro response to CQ was also compared between these two groups for parasites from Senegal.</p> <p>Results The trends in the proportion of parasites that carried pfcr 76T, and pfdhfr 108N, were compared for parasites from travellers and patients within-country using the slopes of the curves over time; no significant differences in the trends were found for any of the 4 countries. These results were supported by in vitro analysis of parasites from the field in Senegal and travellers returning to France, where the trends were also not significantly different.</p> <p>Conclusion The results have not shown difference trends in resistance between parasites derived from travellers or from parasites within-country. This work highlights the value of an international database of drug responses in travellers as an additional tool to assess the emergence of drug resistance in endemic areas where information is limited.</p>
Order of Authors:	<p>Myriam Gharbi, PharmD, MPH</p> <p>Jennifer A Flegg</p> <p>Bruno Pradines</p> <p>Ako Berenger</p> <p>Magatte Ndiaye</p> <p>Abdoulaye A Djimdé</p> <p>Cally Roper</p> <p>Véronique Hubert</p>

1 **Title**

2 **Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug**
3 **resistance in endemic countries**

4
5
6 **Affiliations**

7 Myriam Gharbi^{1,2,3,4*}, Jennifer A. Flegg^{3,5}, Bruno Pradines^{6,7,8}, Ako Berenger⁹, Magatte
8 Ndiaye¹⁰, Abdoulaye A. Djimdé¹¹, Cally Roper¹², Véronique Hubert¹³, Eric Kendjo¹⁴, Meera
9 Venkatesan^{3,15}, Philippe Brasseur¹⁶, Oumar Gaye¹⁰, André T. Offianan⁹, Louis Penali³,
10 Jacques Le Bras^{1,2,3,13}, Philippe J. Guerin^{3,4,5,17}, Members of the French National Reference
11 Center for Imported Malaria Study

12
13 **Affiliations**

14 ¹Mère et enfant face aux infections tropicales, IRD unité mixte de recherche 216, Paris,
15 France

16 ²PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France

17 ³WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN)

18 ⁴EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité, France

19 ⁵Centre for tropical Medicine, University of Oxford, Nuffield Department of Clinical
20 Medicine, CCVTM, Oxford, UK

21 ⁶Unité de Parasitologie, Département d'Infectiologie de Terrain, Institut de Recherche
22 Biomédicale des Armées, Marseille, France

23 ⁷Aix Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales
24 Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Marseille, France

1 ⁸Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France

2 ⁹Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Malariology department, Abidjan, Côte d'Ivoire

3 ¹⁰Faculté de Médecine et Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, service de parasitologie,
4 Dakar, Sénégal

5 ¹¹Malaria Research and Training Center, Department of Epidemiology of Parasitic Diseases,
6 Faculty of Pharmacy, University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako,
7 Bamako, Mali

8 ¹²London School of Hygiene and Tropical Medicine, Pathogen Molecular Biology Unit,
9 Department of Infectious Tropical Diseases, London, UK

10 ¹³Centre National de Référence du Paludisme, CHU Bichat-Claude Bernard, APHP, Service
11 de Parasitologie Mycologie, Paris, France

12 ¹⁴Centre National de Référence du Paludisme, CHU Pitié-Salpêtrière, APHP, Université
13 Pierre et Marie Curie Paris6, Service de Parasitologie Mycologie, Paris, France

14 ¹⁵University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

15 ¹⁶Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 198, Dakar, Senegal

16 ¹⁷INSERM and Université Pierre et Marie-Curie-Paris6, UMR S 707: Epidemiology,
17 Information Systems, Modeling, Paris, France

18

19 *Corresponding author: Myriam Gharbi, UMR216, Faculté de Pharmacie Paris Descartes, 4
20 avenue de l'Observatoire 75270 Paris Cedex 06

21 Email: m.gharbi@yahoo.fr, myriam.gharbi@wwarn.org

22 Phone number: +33 (0) 6.16.29.23.23 / Fax: +33 (0) 1.53.73. 96.17

23

1 **Abstract**

2 Introduction

3 There are growing concerns about the emergence of resistance to artemisinin-based
4 combination therapies (ACTs). Since the widespread adoption of ACTs, there has been a
5 decrease in the systematic surveillance of antimalarial drug resistance in many malaria-
6 endemic countries. In addition, high levels of host immunity in malaria-endemic countries
7 complicate the identification of treatment failures associated with resistance. The aim of this
8 work was to test whether data on travellers returning from Africa with malaria could serve as
9 an additional surveillance system for the emergence of drug resistance in endemic-countries.

10 Methodology

11 Data were collected from travellers with symptomatic *Plasmodium falciparum* malaria
12 returning from Senegal, Mali, Cote d'Ivoire or Cameroon and recorded in the French Malaria
13 Reference Centre during the period 1996-2011. Temporal trends of the proportion of parasite
14 isolates that carried the mutant genotype, *pfcr* 76T, a marker of resistance to chloroquine
15 (CQ) and *pfdhfr* 108N, a marker of resistance to pyrimethamine, were compared for travellers
16 and within-country surveys. The *in vitro* response to CQ was also compared between these
17 two groups for parasites from Senegal.

18 Results

19 The trends in the proportion of parasites that carried *pfcr* 76T, and *pfdhfr* 108N, were
20 compared for parasites from travellers and patients within-country using the slopes of the
21 curves over time; no significant differences in the trends were found for any of the 4
22 countries. These results were supported by *in vitro* analysis of parasites from the field in
23 Senegal and travellers returning to France, where the trends were also not significantly
24 different.

25 Conclusion

1 The results have not shown difference trends in resistance between parasites derived from
2 travellers or from parasites within-country. This work highlights the value of an international
3 database of drug responses in travellers as an additional tool to assess the emergence of drug
4 resistance in endemic areas where information is limited.

5

6

1 **Introduction**

2 A decline in artemisinin efficacy has recently been confirmed in several regions in Southeast
3 Asia [1,2,3]. Concerns are growing about the potential for this artemisinin resistance to
4 spread to sub-Saharan Africa, as it has previously been described for other antimalarial drugs.
5 Indeed, resistance to chloroquine (CQ) and sulfadoxine-pyrimethamine (SP) emerged
6 relatively quickly after their introduction and subsequently spread from Asia to Africa [4,5].
7 Early detection of decreasing drug efficacy and the consequent updating of drug policies are
8 crucial elements in the strategy to prevent the emergence or delay the spread of drug
9 resistance [6,7]. In recent years, considerable effort has been made to improve
10 epidemiological antimalarial resistance surveillance in countries with limited resources.
11 Therapeutic efficacy studies remain the gold standard for guiding drug policy, as they take
12 into account the complex interactions between the host, parasite and drug [8]. However,
13 many settings in endemic countries lack the financial resources necessary to maintain a
14 sustainable, accurate and reliable antimalarial resistance surveillance system, resulting in
15 gaps in the spatial and temporal available information.

16 In recent years, globalization and a substantial increase in international travel and population
17 mobility, have provided the potential for the rapid spread of infectious diseases and
18 antimicrobial resistance [9]. More than 900 million international journeys are undertaken
19 annually and this figure has been consistently rising over the years (United Nations World
20 Tourism Organization: UNWTO).

21 Malaria is endemic in over 100 countries and represents an important infectious disease threat
22 for these nations. Of the 125 million people travelling to malaria endemic countries each
23 year, approximately 10,000 malaria infections are reported worldwide in returning travellers.
24 Under-reporting is thought to be substantial and, hence, this number may, in reality, exceed
25 30,000 [10]. In Europe, a 10-fold increase in imported infections was reported from 1970 to

1 2000 (from 1500 to about 15,000 cases); most of these cases were reported in France or the
2 United Kingdom [11]. Travellers who return from endemic countries infected with malaria
3 often present with low immunity against the parasites and there is no risk of re-infection, so
4 they are a particularly valuable source of information.

5 In fact, historically, the emergence of CQ resistance in Africa was mainly detected through
6 surveillance of travellers (Figure 1, Table 1). The current study was undertaken to test the
7 idea that surveillance of parasites from travellers can be used to accurately assess the
8 evolution of antimalarial drug resistance and provide complementary information to existing
9 monitoring. As a proof of concept, the aim was to compare trends in molecular and *in vitro*
10 markers of drug resistance observed in the imported malaria population with the trends
11 described in field studies.

12

13 **Materials and Methods**

14 Data collection

15 The studies were conducted by the National Reference Centre for Malaria (CNR), Paris,
16 France and investigators from the four endemic countries, in collaboration with the
17 WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN).

18

19 *Data from travellers:*

20 Data were collected from travellers with symptomatic *Plasmodium falciparum* malaria
21 returning from malaria-endemic countries during the period 1996-2011. These cases were
22 reported to the French CNR by hospitals participating in the sentinel network for malaria. All
23 the travellers included in this study must have visited a malaria-endemic African country in
24 the two months prior to diagnosis and presented with a *P. falciparum* infection biologically
25 confirmed by thin and thick blood smear. Basic demographic, epidemiologic, clinical, and

1 parasitological information as well as response to treatment, previous malaria infection and
2 travel history information were systematically reported. Blood samples were only collected
3 from hospitals which document anti-malarial drug resistance on a systematic basis in all
4 *Plasmodium* positive diagnosis, before treatment, for molecular and *in vitro* analyses.

5 Molecular markers associated with resistance to CQ and pyrimethamine and CQ
6 susceptibility *in vitro* were the tools used to compare antimalarial drug resistance trends
7 between travellers and field studies.

8 No informed consent was required for this study as the procedures described here were part
9 of the French national surveillance system of malaria. We did not receive ethical approval or
10 waiver to perform this secondary research on samples collected as a part of government
11 surveillance. However, an information note, which explained that the collected blood samples
12 could be used for further research analyses, was provided to the patients who had the
13 possibility to refuse; and the samples were anonymised for this study.

14

15 *Data within-country:*

16 A literature review was performed in PubMed for publications on malaria from African
17 endemic countries during the period 1996-2011. The search terms [*country name* + (pfert OR
18 chloroquine resistance)] and [*country name* + (DHFR OR sulfadoxine-pyrimethamine
19 resistance OR sulfadoxine pyrimethamine resistance)] were used.

20 Four African countries, Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and Cameroon had sufficiently large
21 numbers of both travellers and field molecular data, from 1996-2011, for meaningful
22 comparison and were included in this study.

23 The collaboration of investigators within the four targeted countries, facilitated by WWARN,
24 enabled the collation and standardisation of published field data and the identification and

1 standardisation of unpublished field data. The field studies used for the analyses are
2 summarized in Table 2.

3

4 Laboratory analysis of parasites

5 *Molecular analysis:*

6 Two molecular markers, *pfprt* 76 for CQ resistance and *pfdhfr* 108 for pyrimethamine
7 resistance, were used in this study to compare the trends between travellers and field data.
8 Although the presence of these two markers does not perfectly correlate with treatment
9 failure, each is a good proxy of the intrinsic resistance of the parasite [12,13]. They are used
10 here as a proof of concept since they have been widely and consistently collected in both field
11 studies and travellers surveillance over the period of interest. Due to the availability of
12 travellers' data, the time period of 2000-2011 was studied for *pfprt* 76T, while the time period
13 of 1996-2011 was used for *pfdhfr* 108N.

14 For molecular analyses of parasites from travellers, DNA was extracted from blood samples
15 of *P. falciparum*, using the QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen® before 2008 and the MagNA
16 Pure LC DNA Isolation Kit I, Roche after 2008. PCR and subsequent allele-specific
17 restriction analyses were performed to identify polymorphic codons of interest at the *pfprt* 76
18 locus (Lys to Thr) and the *pfdhfr* 108 locus (Ser to Asn) [14].

19 For field studies, the genotyping methods differed slightly between studies. The detailed
20 method for each study was described in the corresponding publication (see Table 2 for the
21 references to the studies).

22 Only “pure” *pfprt* 76T and *pfdhfr* 108N infections among the total number of samples tested
23 were included to improve comparability of the allele prevalence calculated between studies.

24 Indeed, genotyping methods for detecting mixed infections vary in sensitivity across studies.

25 There is not clear evidence that patients living in endemic countries are more likely to carry

1 mixed alleles (mutant and sensitive) than travellers returning from endemic countries as the
2 number of mosquitoes' bites is not the only factor to consider and the presence of mixed
3 infections is possible after only one bite [15].

4

5 *In vitro assay:*

6 For the *in vitro* susceptibility tests, only data from Senegal were analysed in this study
7 because there were sufficient available data for parasites from both the travellers and within-
8 country isolates over the complete period of interest.

9 For susceptibility tests of parasites from travellers, the following methods were used. The
10 batches of plates were validated on the CQ-susceptible 3D7 reference strain and the CQ-
11 resistant W2 reference strain using the standard 42-hour ³H-hypoxanthine uptake inhibition
12 method in controlled atmospheric conditions in the incubator (5% CO₂, 10% O₂ and 85% N₂)
13 [16,17]. The isotopic microtests were performed, aliquoting 200 µl/well of the suspension of
14 fresh parasitized erythrocytes into 96-well plates pre-dosed with CQ. Radioactivity
15 incorporated by the parasites was measured using a scintillation counter. The CQ
16 susceptibility was calculated as the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of CQ of the isolates
17 tested [18,19]. The drug concentration that inhibited 50% of parasite growth (IC₅₀) was
18 estimated by using nonlinear regression to fit an inhibitory sigmoid E_{max} model [20]. The *In*
19 *Vitro* Analysis and Reporting Tool (IVART) enabled the transformation, standardization and
20 analysis of the data [Woodrow *et al.*, submitted].

21 For within-country surveys, the *in vitro* methods differed between studies and were described
22 in the publications, which are referenced in Table 2. However, the measurement of the drug
23 susceptibility of fresh *P. falciparum* parasites was mainly performed by isotopic assays using
24 the ³H-hypoxanthine uptake inhibition method. The *in vitro* CQ susceptibility was determined
25 by a *P. falciparum* Lactate DeHydrogenase (pLDH) ELISA assay in four studies.

1

2 Statistical analysis

3 *Sample size calculation:*

4 In order to select eligible countries with enough data per year for significant molecular
5 analysis, a sample size calculation was first performed. The basic comparison of the trends
6 used a simple logistic regression model. The prevalence of isolates from traveller samples
7 that carried a mutant allele (P_t) or from studies on field samples (P_f) was the metric used. In
8 the models:

9

$$10 \quad \begin{aligned} \text{logit}(P_t) &= a_t + s_t X \\ \text{logit}(P_f) &= a_f + s_f X \end{aligned} , \text{ and}$$

11

12 where X is the time covariate and a the intercept, the null hypothesis of equal temporal slopes
13 was tested [21]. That is,

$$14 \quad H_0: \text{slope in travellers' data } (S_t) = \text{slope in field data } (S_f)$$

15 A two sided t-test with a test significance level of $\alpha = 0.05$, a power of $1 - \beta = 0.80$ and an
16 effect size of $\delta = 0.157$ was used. The total sample size required for showing a significant
17 difference between the slopes S_t and S_f was $n = 642$ isolates for each data type (field and
18 travellers data) per country.

19

20 *Logistic regression:*

21 For the molecular analysis, a logistic regression model with time as a linear covariate was
22 fitted to the prevalence of the mutant isolates (separately, for the *pfert* 76 and *pfdhfr* 108 data)
23 for the travellers and field studies, for each country. Given the probability of the mutant
24 isolates, the observed number of mutant isolates in each year was assumed to be binomially

1 distributed. The estimated slope of the fitted logistic regression curve for the travellers and
2 field data, the 95% confidence intervals for the slopes and whether the slopes differ
3 significantly from each other are presented (see figures in the results section).

4 For the *in vitro* susceptibility analysis, a Generalized Linear Model (GLM) with a log-link
5 function was fitted to the travellers and field data for the period 2000-2011. The slopes of the
6 changes in CQ susceptibility for the two datasets were assessed to determine whether they
7 differed significantly from null (0) and whether they differed significantly from each other.

8

9 *Software:*

10 All statistical analyses were performed using Stata version 11 for Windows (Stata Corp,
11 College Station, TX, USA) and R version 2.10 (R – project).

12

13 **Results**

14

15 Four African countries had sufficient numbers of field and traveller derived isolates to allow
16 meaningful comparisons between the two populations: Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and
17 Cameroon. The characteristics for the field studies are summarised in Table 2 for each
18 publication. For Senegal, 10 studies were included for *pfcr* 76 analysis over the 2000-2010
19 period; 5 studies for *pfdr* 108 analysis for 1996-2010 and 8 studies for the *in vitro* analysis
20 over the same period. For Mali, 5 studies were included for *pfcr* 76 molecular analysis from
21 2002 to 2010 and 6 studies for *pfdr* 108 analysis from 1996 to 2007. For Cote d'Ivoire, 4
22 studies were included for *pfcr* 76 analysis from 2003 to 2007 and 5 for *pfdr* 108 from 2000
23 to 2008. For Cameroon, 4 studies were included for *pfcr* 76 (2000-2008) and 5 for *pfdr* 108
24 (2000-2008). The detailed characteristics of the patients differed among the studies, but the

1 heterogeneity between studies regarding the population age and the study settings (urban or
2 rural area) was similar for the four countries.

3
4 The median patient age for travellers experiencing malaria after their return to France was 31
5 years, with 79% older than 15 and 61% of the travellers had visited friends and relatives
6 (VFRs) in endemic countries for more than one month. Only 38% reported prophylaxis intake
7 during their travel and most patients presented with uncomplicated malaria (95%) (Table 3).
8 No differences among these characteristics were observed among the four countries except
9 for gender; a majority of travellers to Senegal and Mali were male.

10
11 Between 2000-2011, 2,874 *P. falciparum* positive isolates were collected from travellers for
12 analysis of the *pfcr*t 76 allele prevalence and 3,351 isolates for analysis of the *pf*dhfr 108
13 allele prevalence between 1996-2011. Between 1996 and 2011, 305 fresh blood samples were
14 collected from travellers, and tested in Paris or Marseille to measure susceptibility to CQ *in*
15 *vitro*.

16
17 Figure 2 and Table 4 summarize the temporal trends in the prevalence of the *pfcr*t 76T mutant
18 isolates (associated with CQ resistance) in each of the target countries. The prevalence of the
19 *pfcr*t 76T mutant genotype significantly decreased for travellers between 2000 and 2011 in
20 Senegal ($S_t = -0.17$, $p < 10^{-3}$), Cote d'Ivoire ($S_t = -0.15$, $p < 10^{-3}$) and less dramatically in
21 Cameroon ($S_t = -0.09$, $p < 10^{-3}$). However, over that same period, no overall decrease was
22 observed in isolates from Mali ($S_t = -0.01$, $p = 0.72$).

23 Despite the differences among the 4 countries, when the slopes of the trends for the isolates
24 from travellers (S_t) and from locally studied parasites (S_f) were compared, no significant
25 differences were observed. In Senegal between 2000 and 2011 ($S_t = -0.17$ versus $S_f = -0.21$,

1 p= 0.58), Mali ($S_t = -0.01$ versus $S_f = 0.01$, p= 0.89), Cote d'Ivoire ($S_t = -0.15$ versus $S_f = -0.22$,
2 p= 0.58) and Cameroon ($S_t = -0.09$ versus $S_f = 0.05$, p= 0.26) (Table 4, Figure 2). These data
3 derived from studies of parasites from returning travellers reflected accurately the trends of
4 the prevalence of molecular markers of CQ resistance that were occurring in the countries in
5 which the travellers acquired their malaria.

6
7 Changes in CQ susceptibility were also assessed using the *in vitro* response of isolates. From
8 1996 to 2011 the geometric mean of the IC₅₀ for CQ of the isolates tested *in vitro* decreased
9 in isolates from travellers and those studied in Senegal (Table 4, Figure 3). The geometric
10 means of the IC₅₀ values measured for the isolates from travellers were lower than those
11 measured in Senegal. However, the slopes showing the trends did not differ. ($S_t = -0.05$ versus
12 $S_f = -0.03$, p= 0.26). In this case, as well, the data gathered from travellers was an accurate
13 reflection of the trend among parasite populations in the country of origin.

14
15 The increase of the molecular marker *pfdhfr* 108N has been commonly associated with an
16 increase of pyrimethamine resistance for more than fifteen years [22]. When this parameter
17 was compared between traveller and field-derived isolates, a significant increase in the *pfdhfr*
18 108N genotype was observed in all 4 countries over the period from 1996-2011: Senegal ($S_t =$
19 0.12 , $p < 10^{-3}$), Mali ($S_t = 0.18$, $p < 10^{-3}$), Cote d'Ivoire ($S_t = 0.08$, $p < 10^{-3}$) and Cameroon ($S_t =$
20 0.21 , $p < 10^{-3}$) (Table 4, Figure 4). For this comparison as well, no significant difference was
21 observed in the trends of the molecular marker *pfdhfr* 108N when data from traveller (S_t) and
22 field-derived (S_f) isolates were compared for samples taken between 1996 and 2011: Senegal
23 ($S_t = 0.12$ versus $S_f = 0.15$, p= 0.39), Mali ($S_t = 0.18$ versus $S_f = 0.12$, p= 0.12), Cote d'Ivoire
24 ($S_t = 0.08$ versus $S_f = 0.13$, p= 0.48) and Cameroon ($S_t = 0.21$ versus $S_f = 0.13$, p= 0.75) (Table
25 4, Figure 3). Thus, all three measures of changes in prevalence of molecular markers and *in*

1 *in vitro* parasites resistance to CQ and pyrimethamine demonstrate that information from
2 parasites imported by travellers was an accurate measure of the changes in parasites within
3 the 4 countries studied.

4

5 **Discussion**

6 This study suggests that the surveillance of travellers may be used for monitoring antimalarial
7 drug resistance in endemic countries. The proof of concept was demonstrated using the
8 prevalence of two molecular markers, *pfcr* 76 and *pfdhfr* 108, and *in vitro* susceptibility for
9 CQ. In this study, similar resistance profiles were observed for travellers' and field data over
10 more than 10 years. A decrease of the prevalence of the *pfcr* 76T mutant genotype was
11 observed over a period of 10 years in travellers returning from Senegal, Cote d'Ivoire and
12 Cameroon, whilst this prevalence remains stable in Mali. An increase of mutant genotype
13 isolates for *pfdhfr* 108 was observed in the four countries of West and Central Africa. The *in*
14 *vitro* CQ susceptibility results supported the molecular results for Senegal. The trend in *pfcr*
15 76 is downward while the trend in *pfdhfr* 108 is upward. The fact that screening travellers
16 was able to detect temporal trends in opposite directions strengthens the proof of concept
17 significantly.

18 Sustainable, reliable and systematic monitoring of drug efficacy is needed for tracking
19 resistance [23]. Monitoring antimalarial drug resistance is based on clinical assessment and
20 biological assays as part of a clinical trial [24]. Since the emergence of resistance to CQ, and
21 then later to SP, capacities to conduct such monitoring in endemic countries have
22 substantially improved, but remain very heterogeneous. In particular regions, human and/or
23 technical resources are limited and, as such, conducting a clinical trial for the purpose of
24 surveillance has competed with other high priorities that Ministries of Health must contend
25 with and has not been systematically conducted.

1 Previous studies highlight the usefulness of travellers' surveillance as an early warning
2 detection system for emergence or re-emergence of communicable diseases [25,26,27].
3 Travellers' surveillance has proven in the past to be an effective early alert system for
4 detecting the emergence of CQ resistance (Table 1).

5 One strength of using travellers as a sentinel system of resistance is that detection of clinical
6 therapeutic failure due to resistance is facilitated in this non immune population with a low
7 risk of re-infection. Moreover, the French Malaria Reference Centre use standardized
8 methods for prospectively collecting reliable information.

9 This study does have several limitations. First, due to the complexity of collecting laboratory
10 data systematically, consistently and over a long period of time in both populations, travellers
11 and field studies, only four countries and two molecular markers have been used in this proof
12 of concept. Second, precise information regarding the location of infection within each
13 country could not be collected for *P. falciparum* infected travellers returning from endemic
14 countries. However, travellers did not visit all parts of a country and they were more likely to
15 frequent particular places such as touristic and/or, or business-oriented locations. The
16 reported information was highly dependent on factors such as the areas that were visited, the
17 period of travel, migration history and the political context in endemic areas. Of course, these
18 factors can also impact information on exact locations where patients acquire their infections
19 within the country, as well. Perhaps more importantly, the travellers in this work were not
20 representative of the native population in that their baseline characteristics differ, including
21 age, immune status and parasitemia before treatment. Finally, especially for the field studies,
22 different approaches were used for determining the molecular markers of resistance and the
23 *in vitro* susceptibility for CQ. The heterogeneity between methods is encouraging WWARN
24 to standardise approaches and to develop common tools like IVART (*Woodrow et al.*,
25 submitted).

1 However, these limitations do not diminish the clarity of the outcome presented here.
2 Surveillance of parasites from travellers provided an accurate picture of events occurring in
3 the field. This does not suggest that this approach should replace studies conducted in
4 endemic countries. Rather, information from travellers can be used as an additional
5 surveillance system.

6 Given the utility, surveillance of travellers can be useful in tracking resistance to ACTs, as
7 well. Currently, only the response to the long-acting partner drugs, can be assessed, but if
8 putative molecular markers are defined, tracking of resistance to the artemisinin component
9 can also be added. The collaboration between Ministries of Health in endemic countries and
10 the malaria reference centres in non-endemic countries for sharing and validating collected
11 information should be reinforced and facilitated.

12 Due to the length of time between a field study and the publication of results, data collected
13 from imported cases may be available in a more timely manner and, as such, could be used
14 for early alert of emerging resistance. The complexity of the available tools for assessing
15 drug efficacy and monitoring resistance highlights the importance of a standardized and
16 coordinated approach. The follow-up of imported cases in several non-endemic countries
17 should also enable the collaborators to track the evolution of resistance to antimalarial drugs
18 at an international scale and thus provide novel information of value to policy makers.

19 The goal of this work was to validate the use of international traveller surveillance systems,
20 for detecting the emergence of antimalarial drug resistance and for following resistance
21 trends where local information is not otherwise available and/or sufficient. Easy access to
22 reproducible and standardized data should be implemented. The existing health international,
23 European or American institutions (WHO, European Centre for Disease Prevention and
24 Control (ECDC), US Centres for Disease Control and Prevention (CDC Atlanta) and the
25 different networks for infectious diseases surveillance in travellers (TropNet Europe,

1 EuroTravNet, GeoSentinel) should be used for facilitating the coordination and data sharing
2 between national surveillance systems [26,27,28].
3

4 **Conclusions**

5 This study has not shown difference trends in resistance between travellers and field studies.
6 An international travellers database can be used as an additional surveillance system to assess
7 and monitor the emergence of drug resistance in endemic areas where information is limited.
8

9

10

10 **Competing interests**

11 The authors declare that they have no competing interests.
12

13

13 **Acknowledgments**

14 We thank Prof Carol Sibley for critical reading of the manuscript. The authors would like to
15 thank Sandie Menard and Antoine Berry for generously providing additional information and
16 data from their previous publication. The authors would like to thank Fabrice Legros
17 (deceased) for his contribution to the study. This study was supported in part by a grant for
18 doctoral studies to M Gharbi from the Doctoral Network of the École des Hautes Études en
19 Santé Publique, Rennes, France and a grant for CNRpaludisme from Institut National de
20 Veille Sanitaire, St Maurice, France.
21

22

23

23 **References**

24

- 1 1. Phyto AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, et al. (2012) Emergence of
2 artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study.
3 *Lancet* 379: 1960-1966.
- 4 2. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, et al. (2009) Artemisinin resistance in
5 *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361: 455-467.
- 6 3. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, et al. (2008) Evidence of artemisinin-
7 resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359: 2619-2620.
- 8 4. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, et al. (2002) Genetic diversity and
9 chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418: 320-323.
- 10 5. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, et al. (2004) Intercontinental spread of
11 pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305: 1124.
- 12 6. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging
13 infectious diseases. *Nature* 430: 242-249.
- 14 7. WHO (2011) Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC). Geneva:
15 World Health Organization. 88 p.
- 16 8. WHO (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.
17 Geneva: World Health Organization. 116 p.
- 18 9. MacPherson DW, Gushulak BD, Baine WB, Bala S, Gubbins PO, et al. (2009) Population
19 mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerg Infect Dis* 15: 1727-
20 1732.
- 21 10. WHO (2010) International Travel and Health. Geneva: World Health Organization. 264
22 p.
- 23 11. Sabatinelli G, Ejov M, Joergensen P (2001) Malaria in the WHO European Region (1971-
24 1999). *Euro Surveill* 6: 61-65.
- 25 12. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, et al. (2001) A molecular
26 marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344: 257-263.
- 27 13. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, et al. (2002)
28 Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-
29 dapson treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 185: 380-388.
- 30 14. Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, et al. (2001) Analysis of pfcrt point
31 mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol*
32 *Biochem Parasitol* 114: 95-102.
- 33 15. Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O, Durand R (2004) *Plasmodium falciparum* clonal
34 population dynamics during malaria treatment. *J Infect Dis* 189: 195-203.
- 35 16. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of
36 antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob*
37 *Agents Chemother* 16: 710-718.
- 38 17. Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J (2006) Assessment of the drug
39 susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a
40 *Plasmodium lactate* dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory
41 maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory
42 concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3343-3349.
- 43 18. Basco L (2007) Field Application of In Vitro Assays for the Sensitivity of Human
44 Malaria Parasites to Antimalarial Drugs. Geneva: World Health Organization. 202 p.
- 45 19. Pradines B, Hovette P, Fusai T, Atanda HL, Baret E, et al. (2006) Prevalence of in vitro
46 resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium*
47 *falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *J Clin Microbiol* 44:
48 2404-2408.

- 1 20. Le Nagard H, Vincent C, Mentre F, Le Bras J (2011) Online analysis of in vitro resistance
2 to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput Methods Programs*
3 *Biomed* 104: 10-18.
- 4 21. Armitage P (1980) *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford: Blackwell Scientific
5 Publications.
- 6 22. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, et al. (1997)
7 Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate
8 synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and
9 resistance. *J Infect Dis* 176: 1590-1596.
- 10 23. Vestergaard LS, Ringwald P (2007) Responding to the challenge of antimalarial drug
11 resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J*
12 *Trop Med Hyg* 77: 153-159.
- 13 24. Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, Plowe CV (2008) A network to monitor
14 antimalarial drug resistance: a plan for moving forward. *Trends Parasitol* 24: 43-48.
- 15 25. Guerin PJ, Grais RF, Rottingen JA, Valleron AJ (2007) Using European travellers as an
16 early alert to detect emerging pathogens in countries with limited laboratory
17 resources. *BMC Public Health* 7: 8.
- 18 26. Wilson ME (2003) The traveller and emerging infections: sentinel, courier, transmitter. *J*
19 *Appl Microbiol* 94 Suppl: 1S-11S.
- 20 27. Gautret P, Cramer JP, Field V, Caumes E, Jensenius M, et al. (2012) Infectious diseases
21 among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill* 17.
- 22 28. Fogh S, Jepsen S, Efferso P (1979) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*
23 malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 228-229.
- 24 29. Kean BH (1979) Chloroquine-resistant falciparum malaria from Africa. *JAMA* 241: 395.
- 25 30. Moran JS (1983) Failure of chloroquine prophylaxis in *Plasmodium falciparum* in Zaire.
26 *Lancet* 2: 171-172.
- 27 31. Le Bras J, Decazes JM, Deloron P, Verdier F, Modai J (1984) R-II chloroquine-resistant
28 falciparum malaria from Burundi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 410-411.
- 29 32. Le Bras J, Coulaud JP, Bricaire F, Le Bras M, Roue R, et al. (1985) Chloroquine-resistant
30 falciparum malaria in the Congo. *Lancet* 2: 1071.
- 31 33. Sansonetti PJ, Lebras C, Verdier F, Charmot G, Dupont B, et al. (1985) Chloroquine-
32 resistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Lancet* 1: 1154-1155.
- 33 34. Olsen VV, Jensen T, Jorgensen M (1984) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*
34 malaria from Angola. *Lancet* 1: 1462-1463.
- 35 35. Neequaye J, Coene J, Taelman H, Wéry M, Greenberg AE, et al. (1986) In vivo
36 chloroquine-resistant falciparum malaria in western Africa. *Lancet* 1(0): 2.
- 37 36. Le Bras J, Hatin I, Bouree P, Coco-Cianci O, Garin JP, et al. (1986) Chloroquine-resistant
38 falciparum malaria in Benin. *Lancet* 2: 1043-1044.
- 39 37. Hellgren U, Ardal OK, Lebbad M, Rombo L (1987) Is chloroquine-resistant *Plasmodium*
40 falciparum malaria emerging in Senegal or The Gambia? *Trans R Soc Trop Med Hyg*
41 81: 728.
- 42 38. Charmot G, Le Bras J, Doury JC, Baudon D, Roue R, et al. (1988) Chloroquine-resistant
43 *Plasmodium falciparum* malaria from Ivory Coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:
44 392-393.
- 45 39. Chabasse D, De Gentile L, Ligny C, Le Bras J, Rialland X, et al. (1988) Chloroquine-
46 resistant *Plasmodium falciparum* in Mali revealed by congenital malaria. *Trans R Soc*
47 *Trop Med Hyg* 82: 547.
- 48 40. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, et al. (2002) In vitro chloroquine
49 susceptibility and PCR analysis of pfcrt and pfmdr1 polymorphisms in *Plasmodium*
50 falciparum isolates from Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 66: 474-480.

- 1 41. Sarr O, Myrick A, Daily J, Diop BM, Dieng T, et al. (2005) In vivo and in vitro analysis
2 of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitol*
3 *Res* 97: 136-140.
- 4 42. Bertin G, Ndam NT, Jafari-Guemouri S, Fievet N, Renart E, et al. (2005) High prevalence
5 of *Plasmodium falciparum* pfcrt K76T mutation in pregnant women taking
6 chloroquine prophylaxis in Senegal. *J Antimicrob Chemother* 55: 788-791.
- 7 43. Henry M, Diallo I, Bordes J, Ka S, Pradines B, et al. (2006) Urban malaria in Dakar,
8 Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum*
9 isolates. *Am J Trop Med Hyg* 75: 146-151.
- 10 44. Sarr O, Ahouidi AD, Ly O, Daily JP, Ndiaye D, et al. (2008) Mutations in PFCRT K76T
11 do not correlate with sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine failure in Pikine,
12 Senegal. *Parasitol Res* 103: 765-769.
- 13 45. Bob NS, Diop BM, Renaud F, Marrama L, Durand P, et al. (2010) Parasite polymorphism
14 and severe malaria in Dakar (Senegal): a West African urban area. *PLoS One* 5:
15 e9817.
- 16 46. Ndiaye D, Patel V, Demas A, LeRoux M, Ndir O, et al. (2010) A non-radioactive DAPI-
17 based high-throughput in vitro assay to assess *Plasmodium falciparum* responsiveness
18 to antimalarials--increased sensitivity of *P. falciparum* to chloroquine in Senegal. *Am*
19 *J Trop Med Hyg* 82: 228-230.
- 20 47. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, et al. (2012) Prevalence of molecular
21 markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J* 11:
22 197.
- 23 48. Ndiaye M, Faye B, Tine R, Ndiaye JL, Lo A, et al. (2012) Assessment of the Molecular
24 Marker of *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance (Pfcrt) in Senegal after
25 Several Years of Chloroquine Withdrawal. *Am J Trop Med Hyg* 87: 640-645.
- 26 49. Tekete M, Djimde AA, Beavogui AH, Maiga H, Sagara I, et al. (2009) Efficacy of
27 chloroquine, amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of
28 uncomplicated falciparum malaria: revisiting molecular markers in an area of
29 emerging AQ and SP resistance in Mali. *Malar J* 8: 34.
- 30 50. Djimde AA, Fofana B, Sagara I, Sidibe B, Toure S, et al. (2008) Efficacy, safety, and
31 selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am J Trop*
32 *Med Hyg* 78: 455-461.
- 33 51. Djimde AA, Barger B, Kone A, Beavogui AH, Tekete M, et al. (2010) A molecular map
34 of chloroquine resistance in Mali. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 113-118.
- 35 52. Wele M, Djimde AA, Guindo A, Beavogui AH, Traore IZ, et al. (2011) High frequency
36 of PfCRT 76T in two Malian villages and its prevalence in severe relative to non-
37 severe malaria. *Acta Trop* 119: 11-13.
- 38 53. Ako BA, Offianan AT, Johansson M, Penali LK, Nguetta SP, et al. (2012) Molecular
39 analysis of markers associated with chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine
40 resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites from southeastern Cote-
41 d'Ivoire by the time of Artemisinin-based Combination Therapy adoption in 2005.
42 *Infect Drug Resist* 5: 113-120.
- 43 54. Djaman JA, Ahibo H, Yapi FH, Bla BK, Ouattara L, et al. (2010) Molecular Monitoring
44 of Falciparum Malaria Isolates in Côte d'Ivoire: Genetic Markers (dhfr-ts, dhps,
45 pfcrt, pfmdr-1) for Antimalarial-Drugs Resistance. *Eur J Sci Research* 40: 10.
- 46 55. Ouattara L, Bla KB, Assi SB, Yavo W, Djaman JA (2010) PFCRT and DHFR-TS
47 Sequences for Monitoring Drug Resistance in Adzopé Area of Côte d'Ivoire After the
48 Withdrawal of Chloroquine and Pyrimethamine. *Tropical Journal of Pharmaceutical*
49 *Research* 9: 8.

- 1 56. Basco LK, Ndounga M, Ngane VF, Soula G (2002) Molecular epidemiology of malaria in
2 Cameroon. XIV. Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (PFCRT)
3 gene sequences of isolates before and after chloroquine treatment. *Am J Trop Med*
4 *Hyg* 67: 392-395.
- 5 57. Basco LK (2002) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIII. Analysis of
6 pfcrt mutations and in vitro chloroquine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 67: 388-391.
- 7 58. Mbacham WF, Evehe MS, Netongo PM, Ateh IA, Mimche PN, et al. (2010) Efficacy of
8 amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and their combination for the treatment of
9 uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in children in Cameroon at the time of
10 policy change to artemisinin-based combination therapy. *Malar J* 9: 34.
- 11 59. Menard S, Morlais I, Tahar R, Sayang C, Mayengue PI, et al. (2012) Molecular
12 monitoring of Plasmodium falciparum drug susceptibility at the time of the
13 introduction of artemisinin-based combination therapy in Yaounde, Cameroon:
14 implications for the future. *Malar J* 11: 113.
- 15 60. Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, et al. (2007) Rapid dissemination
16 of Plasmodium falciparum drug resistance despite strictly controlled antimalarial use.
17 *PLoS One* 2: e139.
- 18 61. Ndiaye D, Daily JP, Sarr O, Ndir O, Gaye O, et al. (2005) Mutations in Plasmodium
19 falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal.
20 *Trop Med Int Health* 10: 1176-1179.
- 21 62. Faye B, Ndiaye M, Ndiaye JL, Annie A, Tine RC, et al. (2011) Prevalence of molecular
22 markers of Plasmodium falciparum resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during
23 the intermittent preventive treatment in infants coupled with the expanded program
24 immunization in Senegal. *Parasitol Res* 109: 133-138.
- 25 63. Doumbo OK, Kayentao K, Djimde A, Cortese JF, Diourte Y, et al. (2000) Rapid selection
26 of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase mutants by pyrimethamine
27 prophylaxis. *J Infect Dis* 182: 993-996.
- 28 64. Djimde AA, Dolo A, Ouattara A, Diakite S, Plowe CV, et al. (2004) Molecular diagnosis
29 of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis*
30 190: 853-855.
- 31 65. Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, Traore K, Garba MN, et al. (2005) Impact of
32 trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and
33 disease. *J Infect Dis* 192: 1823-1829.
- 34 66. Dicko A, Sagara I, Djimde AA, Toure SO, Traore M, et al. (2010) Molecular markers of
35 resistance to sulphadoxine-pyrimethamine one year after implementation of
36 intermittent preventive treatment of malaria in infants in Mali. *Malar J* 9: 9.
- 37 67. Djaman JA, Mazabraud A, Basco L (2007) Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities
38 and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of
39 Plasmodium falciparum isolates from Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 101:
40 103-112.
- 41 68. Basco LK, Ndounga M, Tejiokem M, Ngane VF, Youmba JC, et al. (2002) Molecular
42 epidemiology of malaria in Cameroon. XI. Geographic distribution of Plasmodium
43 falciparum isolates with dihydrofolate reductase gene mutations in southern and
44 central Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 67: 378-382.
- 45 69. Tahar R, Basco LK (2006) Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXII.
46 Geographic mapping and distribution of Plasmodium falciparum dihydrofolate
47 reductase (dhfr) mutant alleles. *Am J Trop Med Hyg* 75: 396-401.
- 48 70. Mbacham WF, Evehe MSB, Netongo PM, Ali IM, Nfor NE, et al. (2009) Mutations
49 within folate metabolising genes of Plasmodium falciparum in Cameroon. *African*
50 *Journal of Biotechnology* 8: 6.

- 1 71. McCollum AM, Basco LK, Tahar R, Udhayakumar V, Escalante AA (2008) Hitchhiking
2 and selective sweeps of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine and pyrimethamine
3 resistance alleles in a population from central Africa. *Antimicrob Agents Chemother*
4 52: 4089-4097.
- 5 72. Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, Guiyedi V, Kombila M, et al. (1999) Amodiaquine
6 remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Trans*
7 *R Soc Trop Med Hyg* 93: 645-650.
- 8 73. Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, et al. (1998) In-vitro activity of
9 pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium*
10 *falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother*
11 42: 333-339.
- 12 74. Pradines B, Tall A, Rogier C, Spiegel A, Mosnier J, et al. (2002) In vitro activities of
13 ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in
14 comparison with those of standard antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 7: 265-
15 270.
- 16 75. Pradines B, Tall A, Ramiandrasoa F, Spiegel A, Sokhna C, et al. (2006) In vitro activity
17 of iron-binding compounds against Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *J*
18 *Antimicrob Chemother* 57: 1093-1099.
- 19 76. Fall B, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, et al. (2011) Ex vivo susceptibility of
20 *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, to seven standard anti-malarial
21 drugs. *Malar J* 10: 310.
- 22
23
24
25

26 **Legends**

27 Figure 1: Map of Africa illustrating the emergence of CQ resistance in East, Central and West
28 Africa detected through travellers' surveillance from the late 1970s to the early 1980s. The
29 dates of detection of index cases are displayed. The red arrows show the spread of
30 antimalarial resistance from East Africa to West Africa.

31
32 Figure 2: Observed data, fitted model (by logistic regression) and 95% confidence interval
33 (shaded area) for the prevalence of the *pfprt* 76 mutant isolates from 2000 to 2011 for
34 travellers (red) and field studies (blue) for A-Senegal, B-Mali, C-Cote d'Ivoire and D-
35 Cameroon. Each data point represents the prevalence of resistant isolates per year for

1 travellers' data and per study for field studies, where the size of the circle is proportional to
2 the number of isolates in the sample.

3

4 Figure 3: Observed data, fitted model (by Generalized Linear Model) and 95% confidence
5 interval (shaded area) for the *in vitro* CQ response (IC_{50}) isolates from 1996 to 2011 for
6 travellers (red) and field studies (blue) from Senegal. Each data point represents the \ln (mean
7 IC_{50}) per year for travellers' data and per study for field studies, where the size of the circle is
8 proportional to the number of isolates in the sample.

9

10 Figure 4: Observed data, fitted model (by logistic regression) and 95% confidence interval
11 (shaded area) for the prevalence of the *pfdhfr* 108 mutant isolates from 1996 to 2011 for
12 travellers (red) and field studies (blue) for A-Senegal, B-Mali, C-Cote d'Ivoire and D-
13 Cameroon. Each data point represents the prevalence of resistant isolates per year for
14 travellers data and per study for field studies, where the size of the circle is proportional to
15 the number of isolates in the sample.

16

1 **Tables**

2

3 Table 1: First published cases of CQ resistance in Africa through travellers' surveillance

Country	Date case	Date published	Country of detection	Reference
Kenya	1978	1979	Denmark	[28]
East Africa (Kenya-Tanzania)	1975	1979	United States	[29]
Democratic Republic of the Congo (Zaire)	1982	1983	United States	[30]
Burundi	1983	1984	France	[31]
Republic of the Congo	1984	1985	France	[32]
Cameroon	1984	1985	France	[33]
Angola	1984	1984	Denmark	[34]
Gabon	1985	1986	United States	[35]
Benin	1986	1986	France	[36]
Senegal	1986	1987	Sweden	[37]
Cote d'Ivoire	1987	1988	France	[38]
Mali	1987	1988	France	[39]

4

5

- 1 Table 2: Summary of the molecular and *in vitro* field studies in the four endemic countries
 2 included in the analysis (both published and unpublished)

	Country	Site	Age population	Year of study	Reference
Molecular marker analysis					
<i>Pfprt</i> 76	Senegal	Pikine	≥5ya	2000	[40]
		Pikine	≥18ya	2001	[41]
		Thiadiaye	Pregnant women	2002	[42]
		Dakar	3-65ya	2002	[43]
		Pikine	≥3ya	2004	[44]
		Dakar	all	2004	[45]
		Thies	all	2007	[46]
		Dakar	all	2009-10	[47]
		Central Senegal (3 districts : Mbour, Fatick, Bambey) and Southern Senegal (3 districts : Tambacounda, Velingara, Saraya)	<10ya	2009-11	[48]
		Dakar	all	2010-2011	Pradines, unpublished data
	Mali	Kolle	<5ya	2002-03	[49]
		Bougoula-Hameau	>6mths	2002-04	[50]
		Bancouma, Monteourou, Bandiagara, Faladie, Koulikoro Ba, Sirakoromég, Niena, Kolebougou, Markakoungo, Dimbal, Kafana, Siekorole, Toguel, M'pessoba Banamba, N'debougou	all	2002-04	[51]
		Kangaba et kela	>6mths	2001-03	[52]
		Bandiagara, Faladje Kolle Pongenon	all	2010	Djimdé, unpublished data
	Cote d'Ivoire	Anonkoua-koute (Abidjan), Ayamé, Dabakala	all	2003-08	Ako, unpublished data
		Bonoua and Samo	<5ya	2005	[53]
		Abidjan (2 districts: Yopougon and Adjamé)	Children	2006	[54]
		Adzope	Children	2007	[55]
	Cameroon	Maroua, Ndop, Bafoussam, Hévécam	<5ya	2000-01	[56]
	Yaoundé	>12ya	2000-01	[57]	
	Garoua, Yaounde, Mutengene	<5ya	2004-06	[58]	
	Yaoundé, Mfou (suburb of Yaoundé)	All ages	2005-08	[59]	

<i>Pfdhfr</i> 108	Senegal	Dielmo, Sine Saloum	All	1996-99	[60]
		Pikine, Tambacounda, Thies	≥5ya	2000-03	[61]
		Dakar	3-65ya	2002	[43]
		Dakar	<5ya	2006-08	[62]
		Dakar	all	2009-10	[46]
	Mali	Tieneguebougou	2-12ya	1996	[63]
		Kidal	All	1999	[64]
		Bandiagara	5-15ya	2000	[65]
		Kolle	<5ya	2002-03	[49]
		Bongoula-Hameau	>6mths	2002-04	[50]
		Kolokani	<5ya	2006-07	[66]
	Cote d'Ivoire	Yopougon	<5ya	2000-01	[67]
		Anonkoua-koute (Abidjan), Ayamé, Dabakala		2003-08	Ako, unpublished data
		Bonoua and Samo	<5y	2005	[53]
		Abidjan (2 districts: Yopougon and Adjamé)	Children	2006	[54]
		Adzope	Children	2007	[55]
	Cameroon	Bertoua, Douala, Eseka, Yaounde	<5ya	1999	[68]
	Bafoussam, Bertoua, Djoum, Garoua, Hevecam, Manjo, Maroua, Mengang, Ndop, Ngaoundere, Sangmelima, Yaounde	<10ya	1999-03	[69]	
	Dschang, Fontem, Limbe, Nkambe	<10ya	2002-03	[70]	
	Garoua, Mutengene, Yaounde	<5ya	2004-06	[58]	
	Yaounde	≥12ya	2001-05	[71]	
<i>In vitro</i> susceptibility test					
chloroquine	Senegal	Mlomp		1996-98	[72]
		Pikine, Dielmo, NDiop	All	1996	[73]
		Dielmo, NDiop		1997	[74,75]
		Pikine	≥5ya	2000	[40]
		Pikine	≥18ya	2001	[41]
		Dakar		2002	[43]
		Dakar		2009-2010	[76]

1
2

1 Table 3: Characteristics of travellers returning from Senegal, Mali, Cote d'Ivoire and
 2 Cameroon and reported in France during the period from 2000 to 2011

Travellers	Senegal (n = 1,993) *	Mali (n = 2,372) *	Cote d'Ivoire (n = 4,778) *	Cameroon (n = 3,272) *
Median age (year) [Min-Max]	30 [0-94]	31 [0-76]	30 [0-83]	33 [0-87]
Gender ratio (Male/Female)	2.47	2.20	1.40	1.15
Chemoprophylaxis				
Yes n (%)	746 (38)	959 (41)	1,955 (41)	1,048 (32)
Duration of stay				
≤ 2weeks n (%)	218 (13)	152 (8)	457 (12)	439 (16)
2-4weeks n (%)	356 (21)	361 (18)	1,150 (30)	868 (33)
1-3months n (%)	699 (41)	928 (48)	1,221 (32)	679 (25)
>3months n (%)	428 (25)	498 (26)	1,021 (26)	688 (26)
Purpose of travel				
Tourism n (%)	322 (18)	251 (12)	514 (12)	397 (13)
VFRs n (%)	1,108 (61)	1,520 (71)	2,482 (58)	1,738 (59)
Severe malaria				
Yes n (%)	136 (7)	123 (5)	225 (5)	177 (5)

3 *Numbers may not add to totals because of missing information
 4
 5

1

2 Table 4: Comparison between travellers and field data for the *pfprt* 76 and *pfdhfr* 1083 molecular markers and for the CQ *in vitro* susceptibility in Senegal

	Country	Travellers' Slope [95% CI**]	Field Study Slope [95% CI]	p-value
<i>Pfprt</i> 76	Senegal	-0.167 [-0.219 ; -0.115]	-0.208 [-0.312 ; -0.105]	0.575
	Mali	-0.009 [-0.082 ; 0.063]	0.005 [-0.106 ; 0.116]	0.885
	Cote d'Ivoire	-0.146 [-0.215 ; -0.078]	-0.215 [-0.463 ; 0.032]	0.578
	Cameroon	-0.090 [-0.146 ; -0.033]	0.050 [-0.220 ; 0.321]	0.264
<i>Pfdhfr</i> 108	Senegal	0.117 [0.088 ; 0.147]	0.148 [0.088 ; 0.209]	0.386
	Mali	0.182 [0.124 ; 0.240]	0.119 [0.086 ; 0.152]	0.116
	Cote d'Ivoire	0.083 [0.052 ; 0.113]	0.132 [-0.025 ; 0.289]	0.484
	Cameroon	0.213 [0.115 ; 0.311]	0.130 [-0.155 ; 0.415]	0.753
CQ <i>In vitro</i> analysis	Senegal	-0.050 [-0.085 ; -0.015]	-0.028 [-0.059 ; 0.002]	0.264

4 *The p-value indicates whether the fitted slopes for travellers data and field studies were significantly different
5 from each other

6 ** CI = confidence interval,

7

8

1 **This article has been submitted on behalf of the National Malaria Reference Centre**

2 **Study Group**

3 Ahmed Aboubacar, Patrice Agnamey, Adela Angoulvant, Patricia Barbut, Didier Basset,
4 Ghania Belkadi, Anne Pauline Bellanger, Dieudonné Bemba, Françoise Benoit-Vical,
5 Antoine Berry, Marie-Laure Bigel, Julie Bonhomme, Françoise Botterel, Olivier Bouchaud,
6 Marie-Elisabeth Bougnoux, Patrice Bourée, Nathalie Bourgeois, Catherine Branger, Laurent
7 Bret, Pierre Buffet, Bernadette Buret, Enrique Casalino, Sylviane Chevrier, Frédérique
8 Conquere de Monbrison, Bernadette Cuisenier, Martin Danis, Marie-Laure Darde, Ludovic
9 De Gentile, Jean-Marie Delarbre, Pascal Delaunay, Anne Delaval, Jean Delmont, Guillaume
10 Desoubeaux, Michel Develoux, Jean Dunand, Rémy Durand, Odile Eloy, Nathalie Fauchet,
11 Bernard Faugere, Albert Faye, Odile Fenneteau, Pierre Flori, Madeleine Fontrouge, Chantal
12 Garabedian, Françoise Gayandrieu, Nadine Godineau, Pascal Houzé, Sandrine Houzé, Jean-
13 Pierre Hurst, Houria Ichou, Laurence Lachaud, Agathe Lebuissou, Magalie Lefevre, Anne-
14 Sophie Le Guern, Gwenaël Le Moal, Daniel Lusina, Marie-Claude Machouart, Denis Malvy,
15 Sophie Matheron, Danièle Maubon, Denis Mechali, Bruno Megarbane, Guillaume Menard,
16 Sandie Menard, Laurence Millon, Muriel Mimoun Aiach, Philippe Minodier, Christelle
17 Morelle, Gilles Nevez, Philippe Parola, Daniel Parzy, Olivier Patey, Pierre Patoz, Pascale
18 Penn, Alice Perignon, Stéphane Picot, Jean-Etienne Pilo, Isabelle Poilane, Denis Pons, Marie
19 Poupert, Didier Raffenetot, Christophe Rapp, Marie-Catherine Receveur, Claudine Sarfati,
20 Yaye Senghor, Fabrice Simon, Jean-Yves Siriez, Nicolas Taudon, Marc Thellier, Maxime
21 Thouvenin, Dominique Toubas

22

Figure1
[Click here to download high resolution image](#)

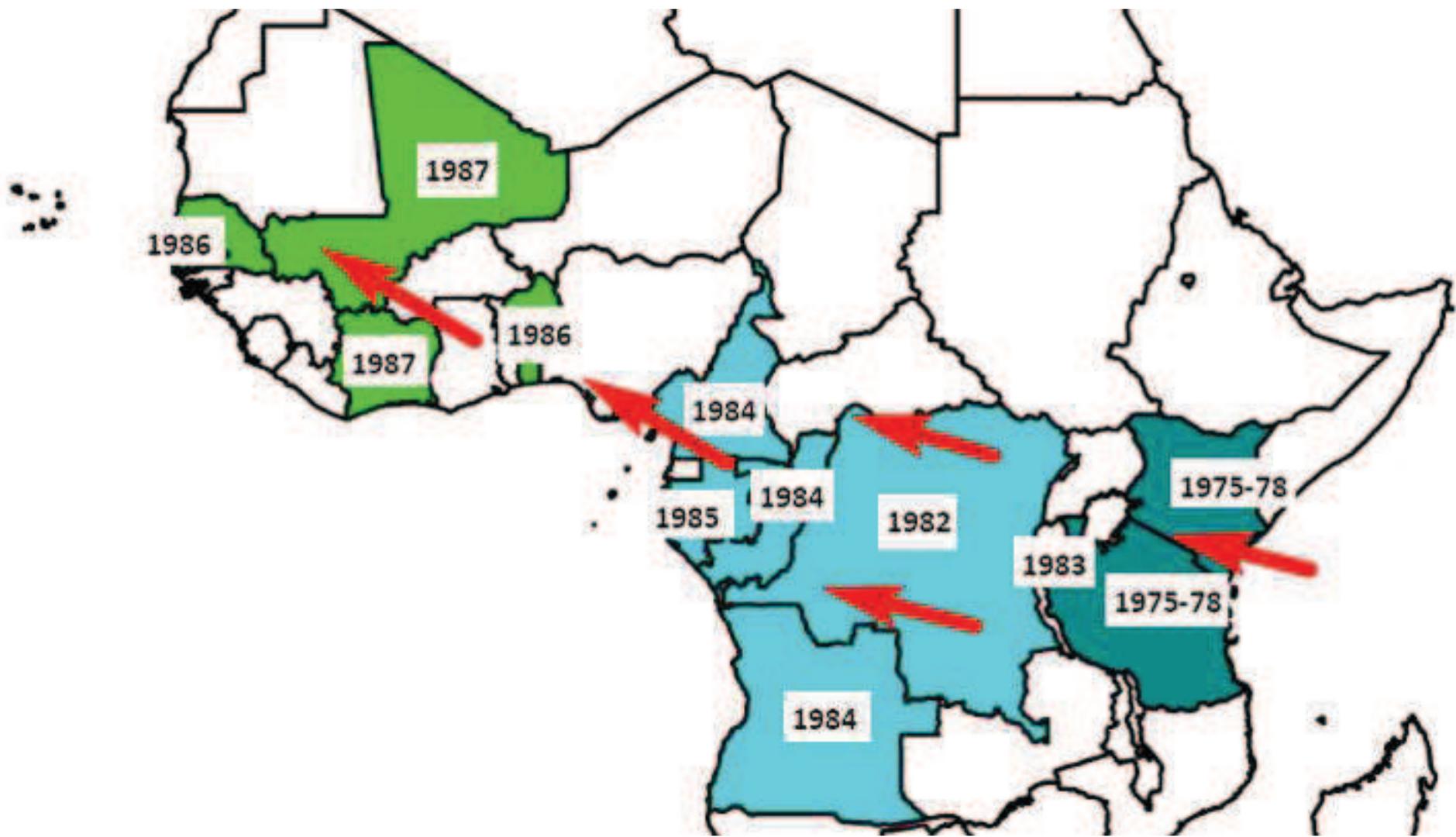


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

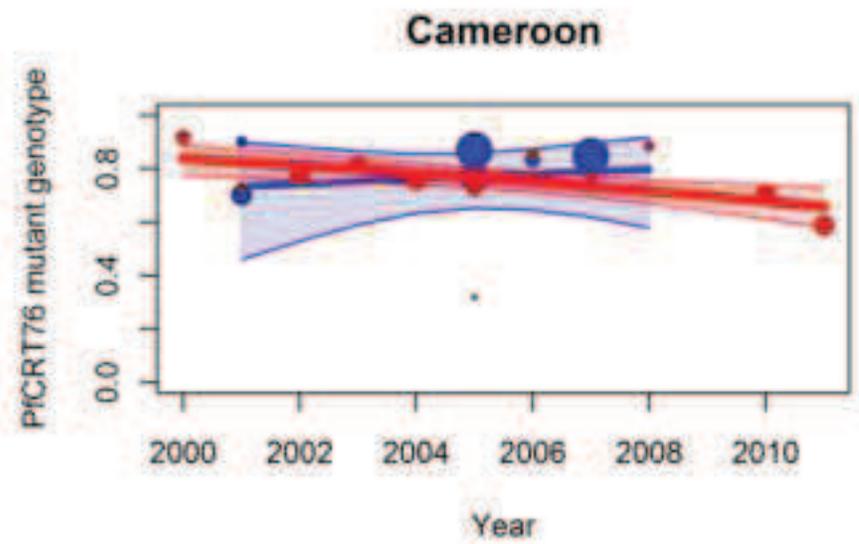
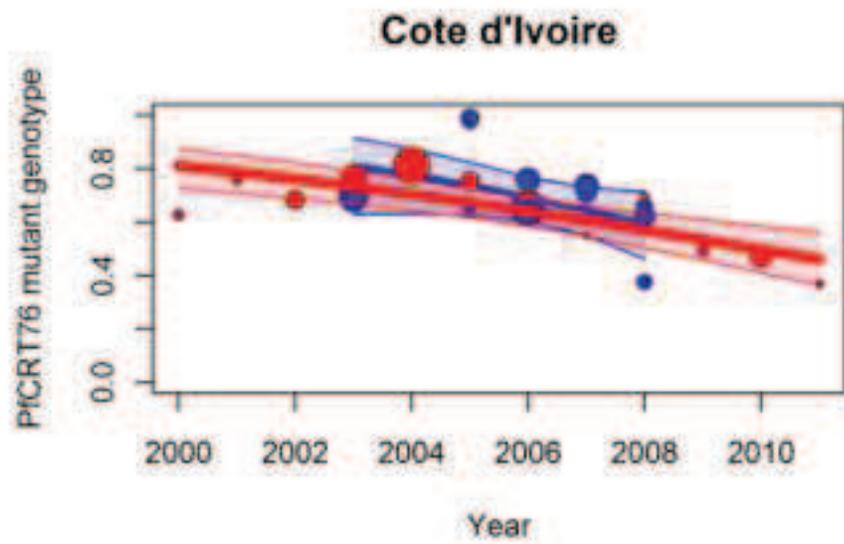
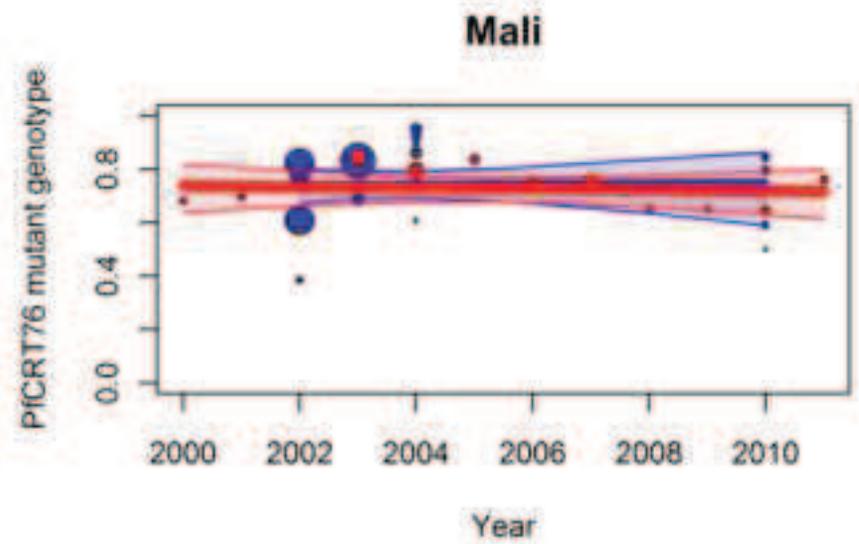
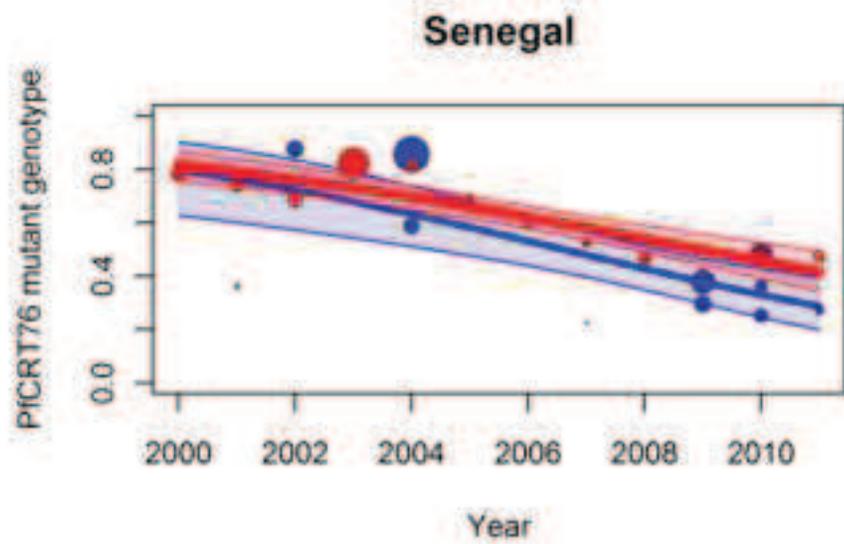


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)

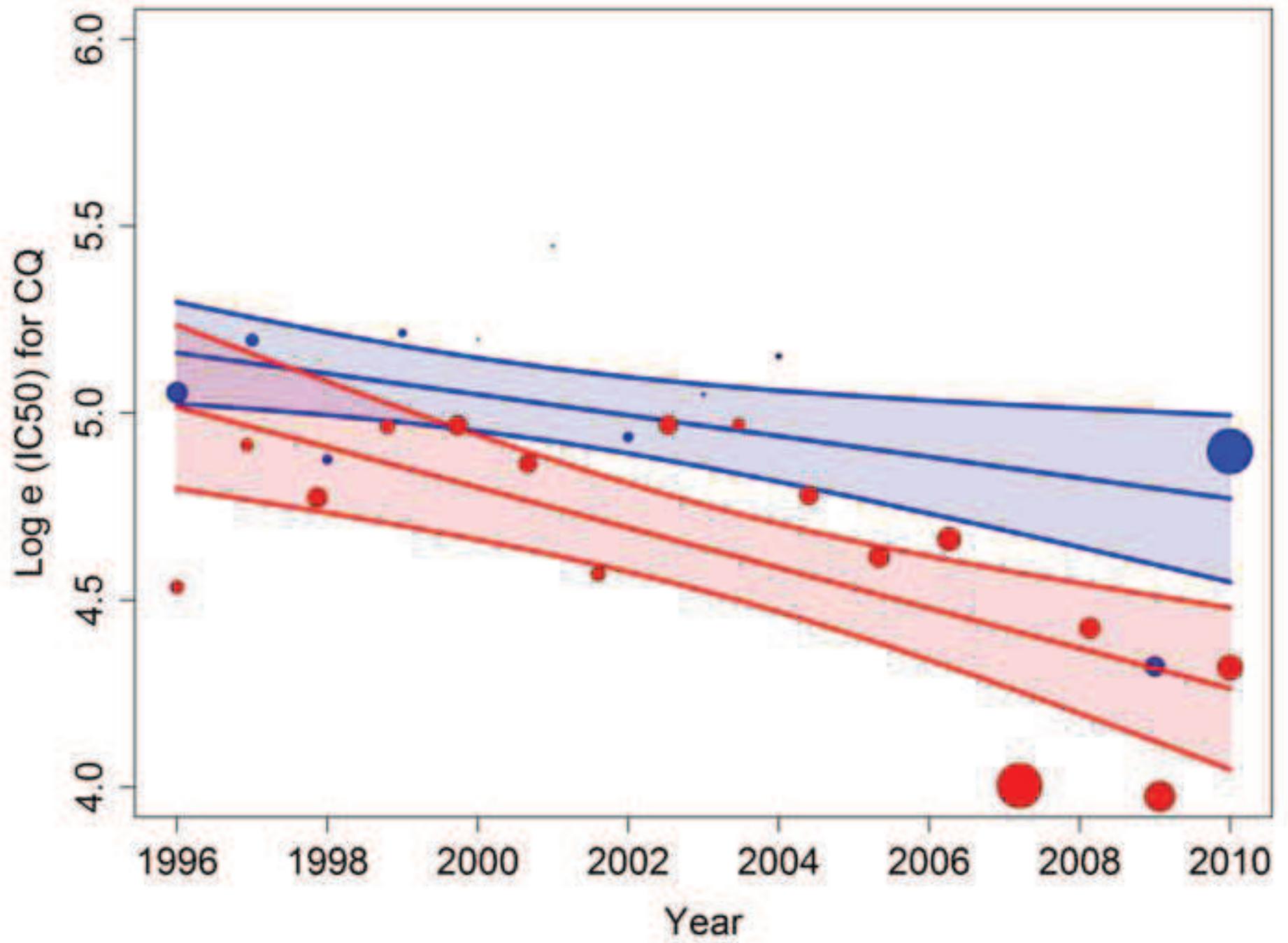
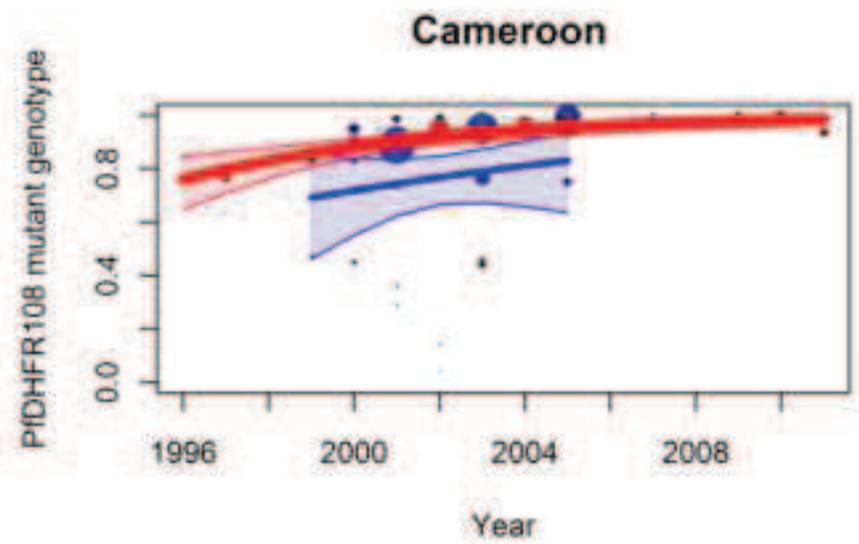
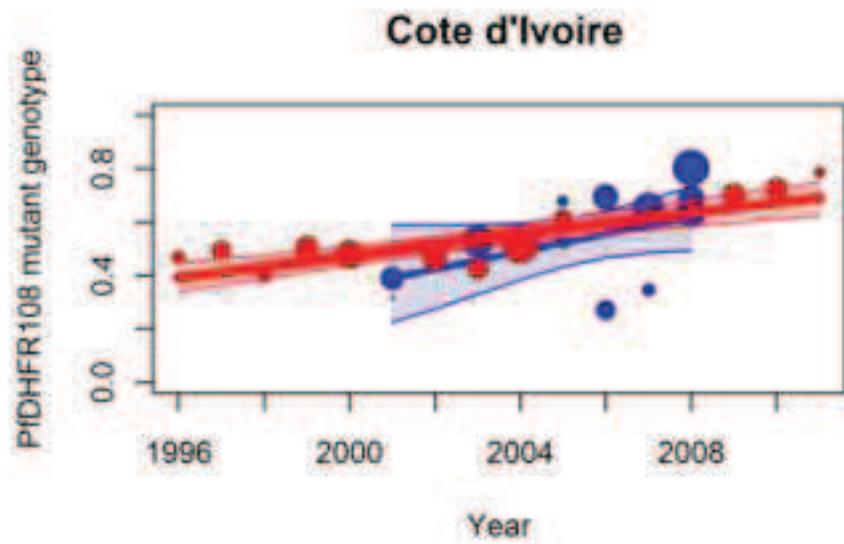
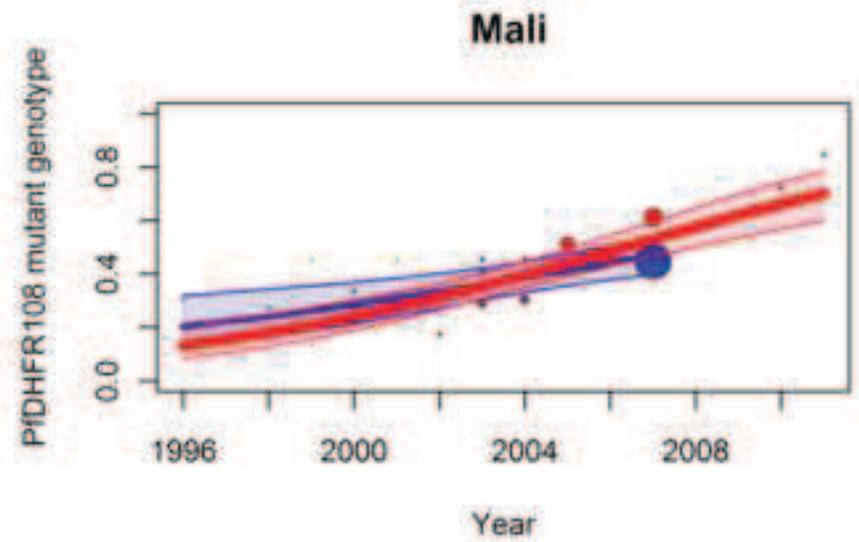
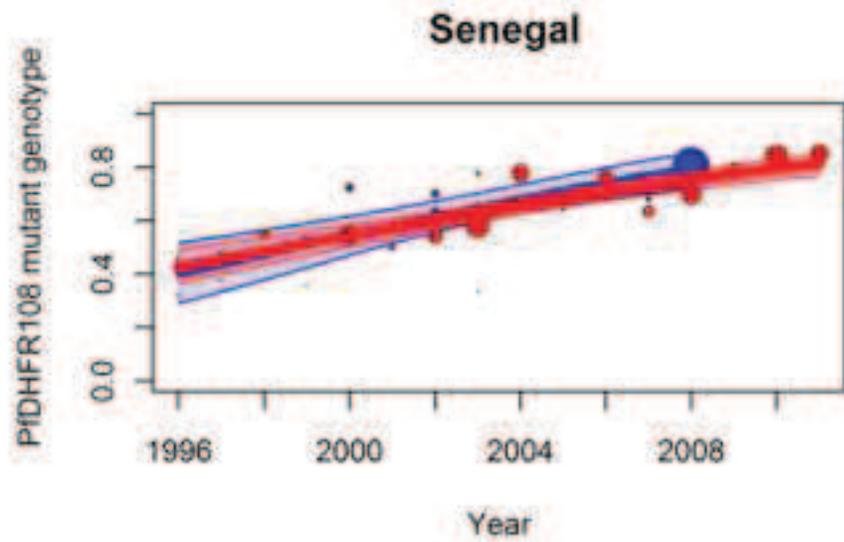


Figure4
[Click here to download high resolution image](#)



5 - LA SURVEILLANCE DES
VOYAGEURS COMME OUTIL DE
DETECTION DE L'EMERGENCE DE
LA RESISTANCE (ARTICLE 2)

Gharbi M, Pillai DR, Lau R, Hubert V, Khairnar K, Existe A, Kendjo E, Dahlström S, Guérin PJ, Le Bras J; French National Reference Center for Imported Malaria Study. Chloroquine-resistant malaria in travelers returning from Haiti after 2010 earthquake. *Emerg Infect Dis.* 2012 Aug;18(8):1346-9. doi: 10.3201/eid1808.111779.

5.1 Problématique de l'article 2

L'étude qui suit est une première application du bénéfice qui existe à utiliser la surveillance des voyageurs comme sentinelle de l'émergence de la résistance.

En dépit de l'émergence de la résistance à la chloroquine en Asie du Sud-Est et sur l'ensemble du continent africain depuis la fin des années 50s, la chloroquine reste officiellement la première ligne de traitement dans le paludisme non compliqué à *P. falciparum* en Haïti. Pourtant, jusqu'ici, très peu d'études ont investigué la sensibilité des souches haïtiennes à la chloroquine, en raison des contraintes budgétaires et de la faible capacité des structures sanitaires. Une étude réalisée en 2006-2007 a, pour la première fois, montré la présence de parasites porteurs de la mutation *Pfcr76T*, associée à la résistance à la chloroquine, dans 6% des isolats [208]. Or, en Janvier 2010, un séisme dévastateur, suivi dans l'année par l'ouragan « Tomas » et par de violentes inondations, pourraient avoir créé les conditions nécessaires à l'augmentation de l'incidence des infections à *P. falciparum* et à la diffusion des souches résistantes.

Le travail qui suit a donc pour objectif de répondre à notre problématique : un système sentinelle utilisant les données des voyageurs peut-il permettre de détecter l'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques en zone endémique?

5.2 Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, nous avons investigué la sensibilité à la chloroquine des parasites *P. falciparum* provenant d'isolats de voyageurs de retour d'Haïti et diagnostiqués en France ou au Canada. Les données ont été collectées de façon rétrospective au sein du Centre National de Référence du Paludisme, France et du Public Health Ontario, Canada sur les périodes 1988-2010 et 2007-2010, respectivement. La définition d'une infection probablement acquise en Haïti comprenait un voyage dans ce pays dans les deux mois précédents le diagnostic, ainsi qu'un frottis et une goutte épaisse positive pour *P. falciparum*. Les données démographiques, cliniques, parasitologiques ainsi que l'histoire thérapeutique et de voyage du patient ont été collectées. Des analyses moléculaires du marqueur moléculaire de résistance de la chloroquine, *Pfcr76*, et des tests de sensibilité *in vitro* à la chloroquine ont été réalisés pour évaluer la résistance des échantillons à cette molécule.

Au cours de la période précédant le séisme de Janvier 2010, l'ensemble les isolats de *P. falciparum* analysés à partir du sang des patients de retour d'Haïti en France et au Canada (n=29), n'ont montré que la présence de souches sauvages *PfcrK76*, après une analyse moléculaire par PCR-RFLP. La susceptibilité *in vitro* à la chloroquine, mesurée par la concentration inhibitrice 50 (CI50) était en moyenne de 27nM (IC95%, 23-31), soit bien en dessous du seuil de résistance fixé à 100nM. Suite au séisme, nous avons pu mettre en évidence, à travers la surveillance des voyageurs, la présence d'isolats (11%) porteurs de parasites résistants après analyse moléculaire, confirmée par les tests *in vitro* de susceptibilité (CI50 > 500nM).

Cette étude confirme la présence de souches résistantes à la chloroquine en Haïti. La détection de l'émergence de résistance dans une zone où l'information est difficilement disponible a été facilitée par une collaboration internationale pour la surveillance du paludisme d'importation. Ces résultats permettent d'alerter sur l'importance de la mise en place d'études d'efficacité thérapeutique sur le terrain pour guider les stratégies thérapeutiques et prophylactiques en Haïti.

Chloroquine-Resistant Malaria in Travelers Returning from Haiti after 2010 Earthquake

Myriam Gharbi, Dylan R. Pillai, Rachel Lau, Véronique Hubert, Krishna Khairnar, Alexandre Existe, Eric Kendjo, Sabina Dahlström, Philippe J. Guérin, Jacques Le Bras, and members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study¹

We investigated chloroquine sensitivity to *Plasmodium falciparum* in travelers returning to France and Canada from Haiti during a 23-year period. Two of 19 isolates obtained after the 2010 earthquake showed mixed *pfcr* 76K+T genotype and high 50% inhibitory concentration. Physicians treating malaria acquired in Haiti should be aware of possible chloroquine resistance.

In Haiti (2011 population \approx 9.7 million), malaria is endemic. Approximately 30,000 malaria infections are confirmed annually among \approx 200,000 estimated malaria cases, mainly *Plasmodium falciparum* infections (1). On January 12, 2010, a 7.0 magnitude earthquake struck Haiti near Port-au-Prince, leaving much of the population homeless.

The main malaria vector in Haiti, *Anopheles albimanus* mosquitoes, which mostly bite outdoors during November–January, placed evacuees at high risk for infection (2,3).

Author affiliations: Université Paris-Descartes, Paris, France (M. Gharbi, J. Le Bras); École des Hautes Études en Santé Publique, Rennes, France (M. Gharbi, P.J. Guérin); Worldwide Antimalarial Resistance Network, Paris (M. Gharbi, S. Dahlström, J. Le Bras); Public Health Ontario, Toronto, Ontario, Canada (D.R. Pillai, R. Lau, K. Khairnar); University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada (D.R. Pillai); Hospital Bichat-Claude Bernard, Paris (V. Hubert, J. Le Bras); Laboratoire National de Santé Publique, Port-au-Prince, Haiti (A. Existe); Centre National de Référence Paludisme, Paris (V. Hubert, E. Kendjo, J. La Bras); Hospital Pitié-Salpêtrière, Paris (E. Kendjo); Université Pierre et Marie-Curie-Paris VI, Paris (E. Kendjo); Worldwide Antimalarial Resistance Network, Oxford, UK (P.J. Guérin); Centre for Tropical Medicine, Oxford (P.J. Guérin); University of Oxford, Oxford, UK (P.J. Guérin); and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris (P.J. Guérin)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111779>

Severe flooding after hurricane Tomas in November 2010 probably compounded the problem by facilitating parasite reservoirs and mosquito breeding (4). Some studies suggest that these events might have increased malaria transmission in Haiti. Two observational surveys, 1 performed by a mobile medical team during March–April 2010 (5) and 1 during November 2010–February 2011 in a primary care clinic in Leogane (6), reported a high proportion of malaria infection among persons with fever (20.3% and 46.9%, respectively) compared with reports from a population-based survey in 2006 (14.2%) (2). The US National Malaria Surveillance System reported a 3-fold increase in malaria among travelers returning from Haiti in 2010 (170 cases) compared with 2009 (58 cases) (7).

Chloroquine associated with primaquine since 2009, is the recommended first-line treatment for uncomplicated malaria. In vitro and molecular surveillance data collected during the past 2 decades suggest continued *P. falciparum* sensitivity to chloroquine (3,8,9). However, a 2006–2007 study in Artibonite Valley, Haiti, showed the chloroquine resistance-associated *Pfcr*76T genotype in \approx 6% (5/79) of *P. falciparum* isolates, although clinical data were lacking (10). Subsequently, the Haitian Ministry of Health acknowledged that routine chloroquine efficacy surveillance should be reinforced (11). We investigated the chloroquine sensitivity of *P. falciparum* parasites isolated from travelers recently returned from Haiti to Canada and France by using genotypic and phenotypic methods.

The Study

We collected retrospective data from the National Malaria Reference Centre (Paris, France) and Public Health Ontario (Toronto, ON, Canada) during 1988–2010 and 2007–2010, respectively. *P. falciparum* infection was considered probably acquired in Haiti if biologically confirmed by thin and thick blood smears from persons who had recently traveled to Haiti in the 2 months before infection was diagnosed. Basic demographic and epidemiologic data, clinical and parasitologic information, treatment, and history of travel and *P. falciparum* infection were collected systematically. Forty of 80 participating hospitals in the sentinel network in France also documented resistance to antimalarial drugs. Pretreatment isolates were collected to determine chloroquine susceptibility by molecular analysis of the *Pfcr*76 locus and by comparing the ratio of in vitro chloroquine response of the clinical isolate with a chloroquine-sensitive reference clone.

Seventy-nine imported *P. falciparum* infections were recorded: 49 before the earthquake (all in France) and 30 after the earthquake (3 in Canada and 27 in France). The

¹Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study who contributed data are listed at the end of this article.

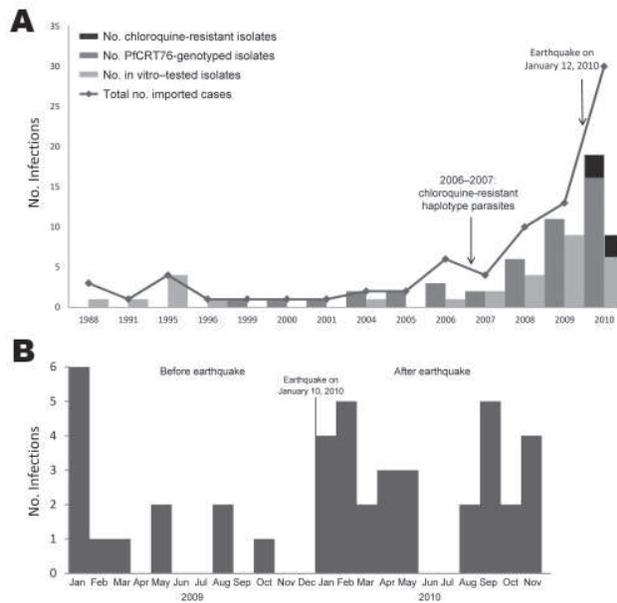


Figure 1. Surveillance during 23 years for antimalarial drug resistance in travelers returning to France and Canada from Haiti after the January 10, 2010, earthquake. A) Imported malaria cases from Haiti reported in France (1988–2010) and Canada (2007–2010). B) Total number of *Plasmodium falciparum* infections, by month, 2009 and 2010.

number of confirmed malaria cases imported from Haiti doubled during 2009–2010 (Figure 1). Approximately half of the travelers were in Haiti 2–4 weeks before the earthquake and >1 month after the earthquake. The main purpose of travel, visiting friends and relatives, decreased from 59% before to 44% after the earthquake. More than 75% of travelers did not take prophylactic medication. The proportion of severe malaria increased from 3% to 11% after January 2010 (Table 1).

Before the earthquake, all 29 isolates had the wild-type *PfprtK76* allele according to analysis by PCR–restriction fragment-length polymorphism. The mean 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of chloroquine for the 24 isolates tested *ex vivo* by the 3H -hypoxanthine uptake inhibition method was 27 nM (95% CI 23–31). These results are consistent with those of an unpublished study conducted in Haiti during 2007 to monitor chloroquine resistance (Jean-François Vely, unpub. data). In that study, Haiti's National Malaria Program, in collaboration with the National Malaria Reference Centre in France, found the chloroquine-sensitive genotype in 146 *P. falciparum*–positive samples in 6 departments (Artibonite, Centre, Grand'Anse, Nord, Nord-Ouest, Ouest) (Figure 2) (12). After the earthquake, 2 (11%) of 19 isolates analyzed by pyrosequencing and PCR–restriction fragment-length polymorphism showed a mixed *Pfprt76K+T* genotype. The ratios of K to T genotypes before and after *in vitro* adaptation were

0.75:0.25 and 0.23:0.77, respectively, for patient 1, and 0.58:0.42 and 0.25:0.75, respectively, for patient 2. The *Pfprt72–76* haplotype was CVMNK before adaptation and CVIET after adaptation for both patients by sequencing. Resistance was confirmed by *in vitro* methods after culture adaptation. Both isolates had high chloroquine IC_{50} (506 nM and 708 nM, respectively) and high chloroquine IC_{50} isolate:*Pf3D7* (chloroquine susceptible clone) ratio (20 and 27, respectively) (Table 2).

Patient 1, a 58-year-old woman, was in Haiti during October 2009–January 2010; she returned after the earthquake to Canada, where she sought care for malaise, fever, diarrhea, and vomiting. She reported no previous malaria and no other travel during the previous 2 years. For patient 2, a 16-year-old girl, malaria was diagnosed in Canada on February 25, 2010, after 3 days of fever. She had traveled to Haiti in the past 2 months before malaria was diagnosed and did not report any other recent travel.

Conclusions

The number of *P. falciparum*–infected travelers returning from Haiti has increased since January 2010,

Table 1. Characteristics of travelers returning from Haiti to France, 1988–2010, and Canada, 2007–2010

Characteristic	Before earthquake, n = 49*	After earthquake, n = 30*
Median age, y (range)	44 (0.7–69)	36 (2–77)
Sex		
M	32 (68)	19 (63)
F	15 (32)	11 (37)
Country of residence		
France	49 (100)	27 (90)
Canada	0	3 (10)
<i>Plasmodium falciparum</i> infection	47 (100)	27 (100)
Chemoprophylaxis		
No	37 (76)	23 (77)
Yes	1 (2)	2 (7)
Unknown	11 (22)	5 (17)
Duration of stay		
≤2 wk	5 (17)	3 (14)
2–4 wk	14 (47)	6 (29)
1–3 mo	7 (23)	7 (33)
>3 mo	4 (13)	5 (24)
Purpose of travel		
Tourism	4 (12)	3 (13)
Visit friends and family	20 (59)	10 (44)
Business	5 (15)	3 (13)
Military	1 (3)	0
Residents or expatriates	1 (3)	5 (22)
≥6 mo		
Other	3 (9)	2 (9)
Severe malaria		
Yes	1 (3)	3 (11)
No	28 (97)	24 (89)
Median parasitemia (range)†	0.47 (0.001–12.000)	0.57 (0.04–14.00)

*Values are no. (%) except as indicated. Numbers may not add to totals because of missing information.

†Percentage of infected erythrocytes per mL blood.



Figure 2. Departments of Haiti.

probably because of the higher number of aid workers and visitors and increased *P. falciparum* malaria transmission. Data suggest that the earthquake and ensuing hurricane and floods created the necessary conditions—inadequate shelters, population movement, and still water—to increase the incidence of malaria and possibly spread the recently identified chloroquine-resistant strains of *P. falciparum* (10). In France and Canada, laboratory surveillance for malaria found that 2 travelers from Haiti carried chloroquine-resistant strains. In vitro culture might have selected resistant strains not observed initially by ex vivo methods. After carefully interviewing these patients about their travels, we found no evidence to cause doubt that they had acquired malaria in Haiti. Alternatively, the resistant strains could have come to Haiti after the earthquake through human activity, as occurred in the cholera outbreak (13).

Table 2. Molecular genotypes and in vitro susceptibility for *Plasmodium falciparum* isolates from patients returning to France and Canada from Haiti

Characteristics	Before earthquake, n = 49	After earthquake, n = 30
In vitro analysis	n = 24	n = 10
IC ₅₀ for chloroquine, nmol/L (mean 95% CI)	27 (23–31)	35 (12–105)*
No. isolates resistant†		
Yes	0	2
No	24	8
Molecular marker analysis, no. (%) isolates	n = 29	n = 19
PfCRT K76	29	17 (89.5)
PfCRT K76+76T	0	2 (10.5)
PfCRT 76T	0	0

*The 2 resistant isolates are included with an IC₅₀ of 506 nmol/L and 708 nmol/L. IC₅₀, 50% inhibitory concentration.

†A threshold of IC₅₀ = 100 nmol/L is applied to determine resistant isolates (consensus between the laboratories in France and Canada) and in vitro susceptibility (IC₅₀) for the isolates from patients returning from Haiti.

The origin of the chloroquine-resistant strains identified in Haiti is uncertain. The *Pfcr* CVIET haplotype is common in Southeast Asia and sub-Saharan Africa and was found in the 2006–2007 study in Haiti (10).

Regardless of origin, containing the spread of chloroquine-resistant parasites is crucial. Malaria elimination is a goal in Haiti, and it has been strengthened after recent events, but the effects of malaria and many other factors affect the achievability of this goal (14). Control measures, possibly mirroring those used to contain artemisinin resistance in Southeast Asia, should be concentrated in Haiti to prevent resistance spreading to the rest of Hispaniola (15). However, lack of consensus on the use of molecular and in vitro data for policy change will hamper decision making. Neither the chloroquine-resistant *Pfcr*76T genotype nor the elevated chloroquine IC₅₀ perfectly predicts treatment failure because of confounding factors like acquired immunity.

Our study has several limitations. Returning travelers are not a representative sample of the Haitian population, and the sample of isolates was limited. The origin of the resistant strains is not defined. Also, the precise location of infection is not reported. Nevertheless, travelers are useful sentinels of emerging resistance in areas where little information is available, providing surveillance data in real time with standardized methods. This nonimmune population also facilitates detection of resistant isolates.

Our data highlight the need to implement a therapeutic efficacy surveillance study for assessing in vivo chloroquine sensitivity, which is essential for providing information for rational control strategies and guiding prophylaxis recommendations in Haiti. In addition, physicians treating malaria acquired in Haiti should be aware of the possibility of chloroquine-resistant infections. Patients with persistent fever despite treatment and infected travelers reporting adherence to chloroquine prophylaxis should be treated with alternate antimalarial drug therapy.

Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study who contributed to this article: Amhed Aboubacar, Patrice Agnamey, Adela Angoulvant, Didier Basset, Ghania Belkadi, Anne-Pauline Bellanger, Dieudonné Bamba, Françoise Benoit-Vical, Antoine Berry, Olivier Bouchaud, Patrice Bourée, Bernadette Buret, Enrique Casalino, Frédérique Conquere de Monbrison, Martin Danis, Pascal Delaunay, Anne Delaval, Michel Develoux, Jean Dunand, Remy Durand, Odile Eloy, Madeleine Fontrouge, Françoise Gayandrieu, Nadine Godineau, Céline Gourmel, Samia Hamane, Sandrine Houze, Houria Ichou, Anne-Sophie Le Guern, Anne Marfaing Koka, Denis Mechali, Bruno Megarbane, Olivier Patey, Isabelle Poilane, Denis Pons, Bruno Pradines, Christophe Rapp, Marie-Catherine Receveur, Claudine Sarfati, Jean-Yves Siriez, Marc Thellier, and Michel Thibault.

Acknowledgments

We thank Valerie Tate for critical reading of the manuscript and Vely Jean-François (deceased) for his contribution to the study.

This study was supported in part by a grant for doctoral studies to M.G. from the Doctoral Network of the École des Hautes Études en Santé Publique, Rennes, France.

Dr Gharbi holds a doctoral degree in pharmacy and is pursuing a PhD degree in epidemiology at the Université Pierre et Marie-Curie, Paris. Her primary research interest is the epidemiology of antimalarial drug resistance.

References

- Centers for Disease Control and Prevention. Malaria acquired in Haiti, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010;59:217–9.
- Eisele TP, Keating J, Bennett A, Londono B, Johnson D, Lafontant C, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in rainy season, Artibonite Valley, Haiti, 2006. Emerg Infect Dis. 2007;13:1494–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1310.070567>
- Bonnlander H, Rossignol AM, Rossignol PA. Malaria in central Haiti: a hospital-based retrospective study, 1982–1986 and 1988–1991. Bull Pan Am Health Organ. 1994;28:9–16.
- Mason J, Cavalie P. Malaria epidemic in Haiti following a hurricane. Am J Trop Med Hyg. 1965;14:533–9.
- Townes D, Existe A, Boncy J, Magloire R, Vely JF, Amsalu R, et al. Malaria survey in post-earthquake Haiti—2010. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:29–31. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0431>
- Neuberger A, Zaulan O, Tenenboim S, Vernet S, Pex R, Held K, et al. Malaria among patients and aid workers consulting a primary health-care centre in Leogane, Haiti, November 2010 to February 2011—a prospective observational study. Euro Surveill. 2011;16:pii:19829.
- Agarwal A, McMorrow M, Arguin PM. The increase of imported malaria acquired in Haiti among US travelers in 2010. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:9–10. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0394>
- Duverseau YT, Magloire R, Zevallos-Ipenza A, Rogers HM, Nguyen-Dinh P. Monitoring of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Haiti, 1981–1983. Am J Trop Med Hyg. 1986;35:459–64.
- Drabick JJ, Gambel JM, Huck E, De Young S, Hardeman L. Microbiological laboratory results from Haiti: June–October 1995. Bull World Health Organ. 1997;75:109–15.
- Londono BL, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Chattopadhyay C, Heyliger G, et al. Chloroquine-resistant haplotype *Plasmodium falciparum* parasites, Haiti. Emerg Infect Dis. 2009;15:735–40. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1505.081063>
- Centers for Disease Control and Prevention. Malaria: Haiti pre-decision brief for public health action [cited 2010 Apr 23]. http://emergency.cdc.gov/disasters/earthquakes/haiti/malaria_predecision_brief.asp
- Maïga-Ascofaré O, Le Bras J, Mazmouz R, Renard E, Falcão S, Broussier E, et al. Adaptive differentiation of *Plasmodium falciparum* populations inferred from single-nucleotide polymorphisms (SNPs) conferring drug resistance and from neutral SNPs. J Infect Dis. 2010;202:1095–103. <http://dx.doi.org/10.1086/656142>
- Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak. N Engl J Med. 2011;364:33–42. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
- Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects. Lancet. 2010;376:1566–78. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61270-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61270-6)
- World Health Organization. Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). Geneva: The Organization; 2011.

Address for correspondence: Myriam Gharbi, UMR216, Faculté de Pharmacie Paris Descartes, 4 Ave l'Observatoire, 75270 Paris, Cedex 06, France; email: m.gharbi@yahoo.fr

ATTENTION!

Action is required to continue receiving the journal

The **September 2012** issue of **Emerging Infectious Diseases** is the last you will receive unless you renew your subscription

subscribe online at

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/subscribe.htm#print-sub>

**or complete the form on the first page of this issue,
and fax to (404) 639-1954 or mail to address on the form,
no later than September 1, 2012.**

6 - LA SURVEILLANCE DES
VOYAGEURS COMME OUTIL DE
SUIVI DE L'EVOLUTION DES
PROFILS DE RESISTANCE
(ARTICLES 3 ET 4)

Flegg JA, Metcalf J, **Gharbi M**, Venkatesan M, Shewchuk T, Carol Hopkins Sibley CH, Guerin PJ. Trends in antimalarial drug use in Africa. Soumis en Mars 2013 à l'American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (AJTMH)

Gharbi M, Flegg J, Hubert V, Kendjo E, Metcalf JE, Bertaux L, Guérin PJ, Le Bras J. Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of Plasmodium falciparum in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000--2011. Malar J. 2013 Jan 25;12(1):35. Doi : 10.1186/1475-2875-12-35

6.1 Problématique des articles 3 et 4

Dans le travail qui suit, nous avons souhaité étudier dans une seconde application le bénéfice qui existe à utiliser la surveillance des voyageurs comme sentinelle de l'évolution des résistances en zone endémique.

Au cours des dernières décennies, la majorité des pays impaludés ont modifié leur politique nationale de stratégie thérapeutique pour adopter les CTAs comme première ligne de traitement. La chloroquine, largement utilisée comme antipaludique de choix pendant près de cinquante ans, a cessé d'être recommandée suite à la diffusion de souches de *P. falciparum* résistantes à cette molécule [23,209,210]. Depuis l'arrêt de sa commercialisation, la baisse de la pression médicamenteuse a engendré des signes de régression de la résistance à cette molécule, observés dans certaines zones d'Afrique [101,211]. Ce changement rapide dans la population parasitaire peut s'expliquer par le potentiel reproducteur des souches (ou « fitness cost »). L'avantage sélectif de survie des parasites résistants disparaît en absence de pression médicamenteuse [102,212,213].

De même pour la SP, l'évolution des résistances a été très liée aux modes de consommation de cette association. Les résistances à la SP ont émergé peu de temps après leur introduction lors des programmes de lutte antipaludique, à la fin des années 1960. Elles se sont répandues rapidement d'Asie du Sud-Est et d'Amérique du Sud à de nombreuses régions d'Afrique [18,61]. Cependant, la SP reste le traitement de choix dans le TPI et pour cette raison et celle du grand usage du triméthoprime+sulfaméthoxazole, un antifolique antibactérien présentant

des résistances croisées avec SP, aucun signe de régression de la résistance n'a été jusque-là observé.

Le travail qui suit a donc pour objectif de répondre à notre hypothèse soulevée dans ce travail : un système sentinelle utilisant les données des voyageurs peut-il permettre de suivre l'évolution des profils de résistance aux antipaludiques en zone endémique?

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à décrire l'évolution des modes de consommation des antipaludiques au cours du temps. En raison de la multiplicité des systèmes de distribution du médicament, réglementés ou non, dans les zones en développement, il a été très complexe de quantifier la notion de pression médicamenteuse. Les données de consommation d'antipaludiques recueillies à partir des enquêtes de Demographic Health Survey (DHS) et Multiple Indicator Cluster Survey (MICS), nous ont permis de modéliser les tendances de l'utilisation de différentes molécules antipaludiques pour une grande partie du continent africain, sur une période de plus de dix ans.

Puis nous nous sommes intéressés à décrire l'évolution de la chloroquino-résistance, à travers la surveillance des voyageurs retournant d'Afrique Centrale et de l'Ouest, suite à la diminution de la pression médicamenteuse. Celle-ci a été initiée au début des années 2000s lors des changements de réglementation nationale.

Une collaboration étroite entre le CNR Palu France et le réseau WWARN nous a permis de mener à bien ces deux défis.

6.2 Résumé des principaux résultats

Article 3

En Afrique, la chloroquine et la SP continuent à être utilisées chez les enfants fiévreux, en dépit de la présence de résistance à ces molécules et des recommandations de l'OMS préconisant largement les CTAs comme première ligne de traitement. Il existe un décalage important entre l'adoption des nouvelles stratégies thérapeutiques et la mise en place de ces politiques à l'échelle locale, ayant pour impact l'augmentation de la mortalité infantile attribuable au paludisme.

L'extraction des données de consommation d'antipaludiques s'est faite à partir des bases de données DHS et MICS. Les tendances de consommation de médicaments dans chacun des pays d'Afrique sur la période 1999-2011, et plus spécifiquement les tendances de la consommation de la chloroquine et de la SP suite aux changements de politique, ont été estimées à l'aide de modèles à effet mixte. Puis, l'estimation de l'utilisation de la SP en Afrique a été corrélée à la prévalence des marqueurs moléculaires associés à la résistance de SP.

Les analyses ont été réalisées sur 92 études pertinentes identifiées, ayant été conduites dans 40 pays africains différents. La réduction de la consommation de la chloroquine suite aux changements de politique varie d'un pays à l'autre selon de nombreux facteurs, sans modèle régional spécifique. En Afrique de l'Ouest et Centrale, on observe une importante réduction de la consommation de la chloroquine ces dix dernières années. Nous avons également mis en évidence le lien qui existait entre la diffusion des résistances à la SP et le délai dans la mise en pratique des nouvelles stratégies thérapeutiques.

En cas de diffusion, ou d'émergence, de la résistance aux artémisinines sur le continent africain, il est essentiel de pouvoir surveiller la consommation des CTAs en regard des stratégies thérapeutiques recommandées. La méthode décrite dans cette étude pourra être répliquée pour estimer et suivre les consommations de médicaments en cours d'utilisation dans le pays, fournissant des informations essentielles pour les décideurs de santé publique.

Article 4

Après nous être intéressés aux évolutions de la consommation de la chloroquine faisant suite aux changements de politique thérapeutique en Afrique, notre objectif a été de décrire les tendances de la chloroquino-résistance en regard de la pression médicamenteuse. L'utilisation de la surveillance des cas importés comme système sentinelle de l'évolution des résistances a été proposée dans cette étude.

Les échantillons ont été collectés à partir des voyageurs diagnostiqués en France pour une infection à *P. falciparum*, de retour du Mali, de la Côte d'Ivoire, du Cameroun ou du Sénégal. L'analyse moléculaire des marqueurs de résistance à la chloroquine, *Pfcr76*, ainsi que l'analyse de la susceptibilité *in vitro* de *P. falciparum* à cette molécule a été réalisée sur les périodes 2000-2011 et 2004-2011. Cette dernière correspond à la période d'arrêt de la commercialisation de la chloroquine dans les pays étudiés. Des modèles de régression logistique et linéaires généralisés nous ont permis d'estimer les tendances des isolats résistants dans les quatre pays ciblés.

La surveillance biologique des échantillons des voyageurs a mis en évidence la baisse significative de la chloroquino-résistance dans quatre pays différents d'Afrique Centrale et de l'Ouest après l'arrêt de commercialisation de la chloroquine. La diminution de la résistance, observée à travers les analyses moléculaires et *in vitro*, a été corrélée à la baisse de pression médicamenteuse.



Trends in antimalarial drug use in Africa

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	AJTMH-13-0129
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	11-Mar-2013
Complete List of Authors:	Flegg, Jennifer; University of Oxford, Nuffield Department of Clinical Medicine Metcalf, Charlotte; University of Oxford, Department of Zoology Gharbi, Myriam; EHESP and IRD – University Paris-Descartes, UMR216 Venkatesan, Meera; University of Maryland, Howard Hughes Medical Institute Shewchuk, Tanya; Malaria & Child Survival Department Population Services International, ACTwatch Sibley, Carol; University of Washington, Department of Genome Sciences Guerin, Philippe; University of Oxford, Nuffield Department of Clinical Medicine
Key Words:	Malaria, Infectious Diseases, Modeling, Therapy/Treatment

TITLE PAGE**Title: Trends in antimalarial drug use in Africa**

Jennifer A Flegg, Charlotte J.E Metcalf, Myriam Gharbi, Meera Venkatesan, Tanya Shewchuk, Carol Hopkins Sibley, Philippe J Guerin

Authors: Name: Jennifer A. Flegg, PhD

Department: WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) and Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, CCVTM, Oxford, UK

Name: Charlotte J E. Metcalf, PhD

Department: Epidemiology and Infectious Diseases, Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Name: Myriam Gharbi, PharmD

Department: WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN), UMR216, IRD – University Paris-Descartes, Paris, France, and EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité, France

Name: Meera Venkatesan, PhD

Department: Howard Hughes Medical Institute, University of Maryland School of Medicine, MD, USA and WorldWide Antimalarial Resistance Network Molecular Module, University of Maryland School of Medicine, MD, USA

Name: Tanya Shewchuk

Department: ACTwatch, Malaria & Child Survival Department Population Services International, Nairobi, Kenya

Name: Carol Hopkins Sibley, PhD

Department: WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) and Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA

Name: Philippe J. Guerin, PhD

Department: WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) and Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, CCVTM, Oxford, UK

Corresponding author:

Name: Jennifer A. Flegg

1
2
3 Department: WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) and
4 Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine,
5 University of Oxford, CCVTM, Oxford, UK
6
7 Mail address: Centre for Tropical Medicine, University of Oxford,
8 CCVTM, Churchill Hospital,
9 Old Road, Oxford, OX3 7LJ, UK
10 Phone: + 44 (0) 1865 8 57456
11 Fax: +44 (0) 1865 8 57407
12 Email: jennifer.flegg@wwarn.org
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Abstract

As a result of resistance to chloroquine (CQ) and sulphadoxine-pyrimethamine (SP), WHO has recommended changes in national drug policies to artemisinin combination therapies. The length of time between policy changes and their implementation affects public health.

Data on antimalarial treatments were extracted from household surveys and national antimalarial policy information from the literature. Drug use in each country during the time period 1999-2011 and the trend in CQ use reduction in the time since policy change was estimated. SP use estimates were correlated to the prevalence of a molecular marker associated with SP resistance.

There was no spatial pattern in the country level rate of reduction of CQ use, after policy change. In East Africa, there was a negative correlation between SP drug use and resistance. If artemisinin resistance spreads to, or emerges in, Africa, the methodology outlined here will be a valuable tool to estimate actual drug use.

Introduction

Chloroquine (CQ) was the most frequently used first line therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* (*P.f.*) malaria from the 1940s through to the 2000s¹. As a result of its high efficacy, good safety profile and low cost, CQ was a key part of the 1950s Global Malaria Eradication Programme². However, factors including funding constraints, lack of political support and the emergence and subsequent spread of resistance to CQ and the pesticides used in vector control hampered eradication plans³. Resistance to CQ was first identified in the late 1950s, on the Thai-Cambodian border and concomitantly in South America⁴⁻⁶. The spread of CQ resistance to Africa ensued, with treatment failures confirmed in 1978 in Kenya and Tanzania^{7,8}, and later reported in West Africa in the 1980s^{9,10}. Despite declining use, CQ remained the first line therapy for uncomplicated *P.f.* malaria in the majority of sub-Saharan countries until after 2000. An increase in malaria morbidity and mortality in children under five years of age was observed during this period, and this trend has been attributed partly to CQ resistance^{11,12}.

During the 1960s, sulphadoxine-pyrimethamine (SP) was introduced in many countries to replace CQ. Due to a rapid decline in efficacy in areas of intense use, first in Southeast Asia in the 1970s and later in East Africa in the late 1980s¹³, SP was withdrawn from African countries as a first line treatment for *P.f.* malaria between 2003-2008. SP continues to be recommended as an intermittent preventative treatment for pregnant women¹⁴ and more recently as part of seasonal malaria chemoprevention in areas of highly seasonal transmission¹⁵.

Over the past decade African countries have transitioned from CQ or SP to artemisinin-based combination therapies (ACTs) as a first line policy for uncomplicated malaria. The transition from CQ took place in most African countries in the late 1990s and 2000s (Figure 1). Malawi was the first African country to change its policy from CQ to SP in 1993. South Africa was the first country to recommend an ACT in 2001, while Malawi and Botswana were the last to switch from SP in 2007 (see animation supplied as web extra material illustrating temporal changes in national antimalarial policies in Africa from 1991 to 2011. Also see Figure 1 and Table S1 in the extra web material).

A reduction in drug pressure has been linked to the return of CQ susceptibility in several malaria endemic countries¹⁶, leading to suggestions that the complete removal of CQ may eventually lead to a return of susceptible parasite populations. However, CQ usage has continued for many years after the switch in national policies for the treatment of *P.f.* In particular, CQ is still commonly used to treat febrile illness in children, especially by those who seek treatment in the private sector¹⁷. Because of the potential influence of this continued use of ineffective drugs on public health, a standardized approach for estimating drug use is needed. In this paper, a methodology is proposed for using reports of actual drug use from publically available household surveys to estimate drug use trends and compare their magnitude in different countries.

Methods

Data extraction

Drug use data collected between 1999 and 2011 in 40 African countries in Demographic Health Surveys (DHS)¹⁸ and Multiple Indicator Cluster Surveys (MICS)¹⁹ were included in the analysis. The DHS and MICS surveys included in this work contained malaria modules, which ask women within a household to report on antimalarial use in children under the age of five within their care, who have experienced fever symptoms in the past two weeks (see Figure S1 and S2 in the Supplementary Methods for extracts from the DHS and MICS surveys, respectively). Details of the data extraction and the aggregation of data to give a survey level drug use measure are given in the Supplementary Methods.

National antimalarial policy information was obtained from the World Health Organization's Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to Antimalarial Drugs Report on Global Monitoring 1996-2004, malaria country profiles 2011, World Malaria Reports, 2005 and 2008 and supplemented by a literature search in PubMed.

Statistical model

The probability of drug use was modelled using a mixed-effects logistic regression model. Time, measured either as the year of the survey or as years after the policy change, was included as a linear covariate. Random effects were included so that the intercept and slope could vary from country to country. For details of the model, see the Supplementary Methods.

Correlation of drug use and parasite drug resistance

When drugs are used intensively in a region or a country, selection of parasites resistant to those drugs is inevitable, especially when already resistant parasites have evolved in other regions and could spread to a new location. A potential measure of actual drug use is the prevalence and trends observed for molecular markers correlated with drug resistance to SP. The work presented here measures the selection pressure exerted by measuring the "relaxation" of the selection by the decline in the actual use of the drug. However, when there are molecular markers that correlate with the prevalence of parasites that are less sensitive to the drug, that metric is also a valuable addition.

Since molecular markers for SP resistance are well characterized, the relationship between SP use and the prevalence of those molecular markers in countries that recommended SP for various lengths of time was explored. A large database of the prevalence of molecular markers associated with resistance to SP has previously been created²⁰. The prevalence of the mutation *dhps540E* is indicative of high SP resistance²¹ and in other work, a spatio-temporal model was developed for the spread of the *dhps540* marker in Africa. Outputs of this model allow estimation of the average *dhps540* prevalence within a country in a given year.

Results

Data extraction

92 surveys from 40 African countries monitored antimalarial use in children between 1999 and 2011 (Table S2). 54 DHS surveys from 28 countries and 38 MICS surveys from 31 countries were included (Table 1). MICS surveys were performed on average earlier than DHS surveys and therefore tended to report a higher level of CQ usage. Table S1 summarises the antimalarial policy changes for malaria endemic African countries.

Chloroquine (CQ)

The time plot in Figure S3 shows the percentage usage of CQ in 88 surveys from 40 countries and shows the general decrease in use from 1999 to 2011. The mixed effects model was applied to estimate CQ use in African countries. Figures S4(a) and S4(b) show the country level intercepts and slopes, respectively, where time was measured as years post 1999. Figure 2 shows the model predictions for CQ use in each country in 1999 (black squares), 2005 (indicated by end of red line) and 2010 (end of green line). Figure 3 illustrates in detail the mixed effects model predictions for CQ use in four countries with different trends: Senegal (intermediate starting CQ use, fast rate of reduction), Nigeria (intermediate starting use, slow rate of reduction), Ghana (high starting use, fast reduction) and Sierra Leone (high initial use, slow reduction). The times at which drug policies changed are given at the top of each graph for ease of comparing with the trends.

To investigate the overall rate at which CQ use declined after policy change, a logistic regression model was fitted to the data from the 52 surveys from 31 countries that monitored CQ use, after it was no longer the first line drug (slope = -0.27, $p < 0.001$). At this rate of reduction, it would take 2.5 years for the odds of CQ use to fall by 50%.

The trend in CQ use in each country after CQ was no longer the first line drug was also examined. The country level intercepts and slopes for CQ use after policy change, from fitting the mixed effects model, are shown in Figure S5(a) and S5(b). The intercept reflects the amount of CQ use at the time of policy change, and the countries are ordered on that basis. Ethiopia and Rwanda used the lowest proportion of CQ at the time of policy change and Ghana and Kenya, the highest. Figure 4 visualises the changing CQ use post policy change in each country, showing the predicted use in the year of policy change (black squares), five years (indicated by end of red line) and ten years after the policy change (end of green line). The spatial trend of CQ use reduction in African countries post policy change is illustrated in Figure 5. There are countries in East and West Africa with slow and fast reduction of CQ use. That is, there is no obvious spatial pattern in the reduction of CQ use.

Sulphadoxine–pyrimethamine (SP)

From Figure 1 it can be observed that many countries never recommended SP, but changed directly from CQ to an ACT. In fact, only nine African countries recommended SP as a first line therapy, but Figure S6 shows that actual use of SP was still common. In order to estimate the SP drug use, a mixed effects model was fitted using SP use data in all countries. Figures S7(a) and S7(b) show the country level intercepts and slopes, respectively, with time measured as post 1999. Figure 6 visualises the changing use of SP in each country after 1999 for countries that recommended SP as a first line therapy and for which there is SP use data available, showing the predicted use in 1999 (black squares), 2005 (indicated by end of red line) and 2010 (end of green line).

There was a significant downward trend in SP usage after policy change from SP to ACTs (logistic regression: slope = -0.55 , $p < 0.001$). However, at this rate of SP reduction it would still take 1.25 years for the odds of SP use to fall by 50%. There were insufficient data to fit a mixed effects model to the SP usage after it was replaced as the recommended first line treatment.

Correlation of SP use to SP resistance

The correlation was assessed between SP use, estimated in this work, and the changes in a molecular marker, *dhps540E*, known to be highly correlated with trends in SP efficacy²¹. The prevalence of the *dhps540E* genotype at the time of a change to SP is poorly correlated with SP use (Table 2). Even when reported drug use declined prior to the change to an ACT, the increase in drug pressure (using upward trends in molecular marker prevalence as a surrogate) continued. In East Africa, SP use and *dhps540E* prevalence were already high when Malawi, Kenya and Tanzania adopted SP, and *dhps540E* continued to increase despite large reductions in SP use. In Zimbabwe, Burundi and DRC, drug use was low throughout the period measured, but increases in *dhps540E* prevalence were still observed. Cote d'Ivoire is the exception, where SP drug use was extremely low (2%) and the *dhps540E* marker was virtually absent for the period when SP was the first line drug. The correlation was measured between drug use and *dhps540E* prevalence in the seven countries during the years when SP was the first line (Figure 7). A strong negative correlation was observed in Malawi ($\rho = -0.97$, $p < 0.001$), Kenya ($\rho = -0.91$, $p = 0.004$) and Tanzania, ($\rho = -0.88$, $p = 0.12$). The remaining countries did not use enough SP for a relationship to be informative.

Artemisinin combination therapies (ACTs)

In the years between 2005 and 2011, 42 surveys monitoring ACT usage across 31 countries were conducted. Due to the low number of surveys in each country and the low reported ACT usage (Figure S8), a mixed effects model was not fitted, but is postponed until the dataset has sufficiently matured. Figure 8 shows the increasing ACT use over the period of 2005 – 2011 (green; regression slope = 0.55 , $p < 0.001$), compared to the decreasing trends in the use of CQ (red; regression slope = -0.13 , $p < 0.001$) and SP (blue; regression slope = -0.04 , $p < 0.001$).

Discussion

Management of drug resistance is crucial for maintaining progress in malaria control and realizing the goal of malaria elimination. One element of effective management is identification of foci of resistance and understanding the factors that shape the trajectory as resistant parasites spread. These factors can be identified by analyzing the historical and contemporary data on patterns of resistance to drugs that have already failed and insight can be gained by modelling those patterns.

Models have been constructed using the rich data set available on CQ and SP use in 40 African countries and defined the trends in actual drug use over time in each country. The model for CQ use trends post policy change in African countries showed striking differences in trends even in neighbouring countries. The absence of regional patterns in the rate of reduction of CQ use suggest that supply and demand side factors vary considerably by country. With this foundation, the model can be extended to identify additional factors that influence the rate of change.

The model quantifies the lag between the adoption of a policy for treatment of suspected *P.f.* infections and the impact of that policy on actual drug use. The time required for a 50% reduction in the odds of CQ usage was 2.5 years and 1.25 years for SP.

It has been suggested that the removal of drug selection pressure can result in the return of parasites susceptible to the drug^{16, 22, 23}, an effect observed when CQ was withdrawn in Malawi^{24, 25}. However, a decline will not occur if drug usage continues after a policy change or if other drugs with related resistance mechanisms exert pressure. For example amodiaquine use selects for resistance to CQ²⁶, and the widespread use of trimethoprim-sulfamethoxazole (Cotrimoxazole) for various bacterial infections and in prophylaxis for HIV acts on the same drug targets as SP²⁷.

The relationship between SP use and drug resistance in key African countries that recommended SP as a first line therapy was investigated. This revealed that Burundi, Zimbabwe and the DRC which had limited SP use showed both high prevalence of SP resistance markers at the time of SP introduction and continued increases in those markers during the time when SP was the national policy, but apparently was used little. One explanation is migration of SP resistant parasites from neighbouring countries in East Africa, such as Kenya, Tanzania and Malawi, which have very high prevalence of SP resistant parasites and sustained SP drug pressure. In contrast, Côte d'Ivoire in West Africa is surrounded by countries that show similarly low levels of SP use, and the resistance markers maintained low prevalence over the whole period. SP is currently recommended for chemoprevention¹⁴ and appears in most national guidelines for intermittent preventative therapy for pregnant women and infants²⁸, which may help to explain the prolonged SP usage. The CQ use data have not been analysed in light of molecular markers associated with CQ resistance since at this time, a comprehensive database of molecular markers that confer resistance to CQ is yet to be completed.

1
2
3 CQ is not currently recommended as part of treatment for *P. f.* malaria in Africa, and
4 only a handful of countries with *P. vivax* recommend CQ. However, CQ usage has
5 persisted for many years after policy change. Studies have shown that between 40-
6 60% of those who seek treatment for fever in malaria endemic countries access
7 drugs in the private sector, where CQ and SP are up to 25 times less expensive than
8 an ACT¹⁷. In fact, this price differential was a primary motivation for the formation
9 of the Affordable Medicines Facility – malaria (AMFm), a program designed to
10 address this disparity²⁹. Furthermore, despite treatment guidelines that
11 recommend ACTs, SP and CQ remain registered in many countries and since they
12 are authorized to move through the marketplace, are highly available¹⁷.
13
14
15

16
17 There are several limitations of the analysis. First, consumption of antimalarials for
18 laboratory confirmed malaria infection might differ from estimates derived from
19 children with fever. Second, drug use in other age groups may not follow the same
20 trends as those in children under 5. Third, there may be substantial differences in
21 drug use within countries and these have not been considered. Fourthly, there was
22 no available measure for the quality of antimalarial received. Finally, some mothers
23 were unable to identify which drugs were used, which is likely to underestimate the
24 true usage of the drugs but would be unlikely to change the main findings.
25
26

27
28 Countries in Africa have changed antimalarial policy to ACTs in the last decade, and
29 increasing drug access to these drugs, both in the public and private sectors, has
30 been supported by large initiatives and funding agencies, including Global Funds,
31 AMFm, the President's Malaria Initiative, the World Bank and UNITAID.
32 Unfortunately, artemisinin resistance has arisen in Southeast Asia and could spread
33 to, or emerge, in Africa or Latin America. Drug pressure is believed to be an
34 important driver of resistance and continuous monitoring is vital to guide policies.
35 Initiatives such as the DHS, MICS and ACT Watch will be essential for providing the
36 necessary data³⁰. The methods described here will be a valuable tool to monitor use
37 of ACTs, and to identify the factors that influence actual drug pressure.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Nuwaha F. The challenge of chloroquine-resistant malaria in sub-Saharan Africa. *Health Policy and Planning*. 2001;16(1):1-12.
2. Greenwood B. Can malaria be eliminated? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103S:S2—S5.
3. Roberts L, Enserink M. Did they really say... eradication? *Science*. 2007;318(5856):1544-5.
4. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. *Lancet*. 1965;2(7414):657-60.
5. Moore DV, Lanier JE. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1961;10(1):5-9.
6. Young MD, Moore DV. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1961;10:317-20.
7. Kihamia CM, Gill HS. Chloroquine-resistant falciparum malaria in semi-immune African Tanzania. *Lancet*. 1982;2(8288):43.
8. Fogh S, Jepsen S, Effersoe P. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1979;73(2):228-9.
9. Hellgren U, Ardal OK, Lebbad M, Rombo L. Is chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria emerging in Senegal or The Gambia? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):728.
10. Kyronseppa H, Lumio J, Ukkonen R, Pettersson T. Chloroquine-resistant malaria from Angola. *Lancet*. 1984;1(8388):1244.
11. Korenromp EL, Williams BG, Gouws E, Dye C, Snow RW. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: An assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003;3(6):349-58.
12. Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;64(1 suppl):12-7.
13. Bjorkman A, Phillips-Howard P. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84(2):177-80.
14. World Health Organization. Country antimalarial drug policies by region. 2012; Available from: http://www.who.int/malaria/am_drug_policies_by_region_afro/en/index.html.
15. World Health Organization. WHO Policy Recommendation: Seasonal Malaria Chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. March 2012; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/smc_policy_recommendation_en_032012.pdf.
16. Frosch AEP, Venkatesan M, Laufer MK. Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: A systematic review of household survey data and molecular data. *Malaria Journal*. 2011;10:116.

17. O'Connell KA, Gatakaa H, Poyer S, Njogu J, Evance I, Munroe E, et al. Got ACTs? Availability, price, market share and provider knowledge of anti-malarial medicines in public and private sector outlets in six malaria-endemic countries. *Malaria Journal*. 2011;10:326.
18. MeasureDHS Demographic Health Surveys (<http://www.measuredhs.com/>).
19. Multiple Indicator Cluster Surveys (<http://www.childinfo.org>).
20. Naidoo I, Roper C. Following the path of most resistance: dhps K540E dispersal in African *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*. 2010;26:447-56.
21. Naidoo I, Roper C. Drug resistance maps to guide intermittent preventive treatment of malaria in African infants. *Parasitology*. 2011;138(12):1469-79.
22. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G, et al. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malaria Journal*. 2009;8(1):106.
23. Malisa AL, Pearce RJ, Abdulla S, Mshinda H, Kachur PS, Bloland P, et al. Drug coverage in treatment of malaria and the consequences for resistance evolution-evidence from the use of sulphadoxine/pyrimethamine. *Malaria Journal*. 2010;9(1):190.
24. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RAG, Wirima JJ, Kazembe PN, et al. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(12):1870-5.
25. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, et al. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;68(4):413-5.
26. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(4):257-63.
27. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *Aids*. 1998;12(8):873.
28. van Eijk AM, Hill J, Alegana VA, Kirui V, Gething PW, ter Kuile FO, et al. Coverage of malaria protection in pregnant women in sub-Saharan Africa: A synthesis and analysis of national survey data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011.
29. The Global Fund to Fight AIDS TaM. Affordable Medicines Facility - malaria. Available from: <http://www.theglobalfund.org/en/amfm/>.
30. Shewchuk T, O'Connell KA, Goodman C, Hanson K, Chapman S, Chavasse D. The ACTwatch project: Methods to describe anti-malarial markets in seven countries. *Malaria Journal*. 2011;10(1):325.

Acknowledgements

We would like to thank Anna Tochlin for assisting in validating the automated DHS and MICS data extraction process. Rachel Ochola and Amadou Seck assisted in the

1
2
3
4 extraction of drug policy information from the literature.
5
6

7 **Abbreviations**

8
9
10 Chloroquine (CQ), sulphadoxine-pyrimethamine (SP), artemisinin combination
11 therapies (ACTs), Demographic Health Surveys (DHS), Multiple Indicator Cluster
12 Survey (MICS), *Plasmodium falciparum* (*P.f.*), Democratic Republic of Congo (DRC),
13 Affordable Medicines Facility – malaria (AMFm).
14

15 **Competing Interests**

16 The authors declare that they have no competing interests.
17
18

19 **Financial Disclosure**

20 WWARN is supported by a Bill and Melinda Gates Foundation grant. No funding
21 bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish,
22 or preparation of the manuscript.
23
24

25 **Author Contributions**

26 Conceived and designed the study design: JAF, CJEM, PJG. Performed literature
27 searches and data collection: CJEM, MV, MG. Analyzed the data: JAF, CJEM
28 Interpreted the data: JAF, CJEM, PJG, CHS, TS. Wrote the first draft of the
29 manuscript: JAF. Contributed to the writing of the manuscript: CJEM, MG, MV, TS,
30 CHS, PJG.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figures

Figure 1

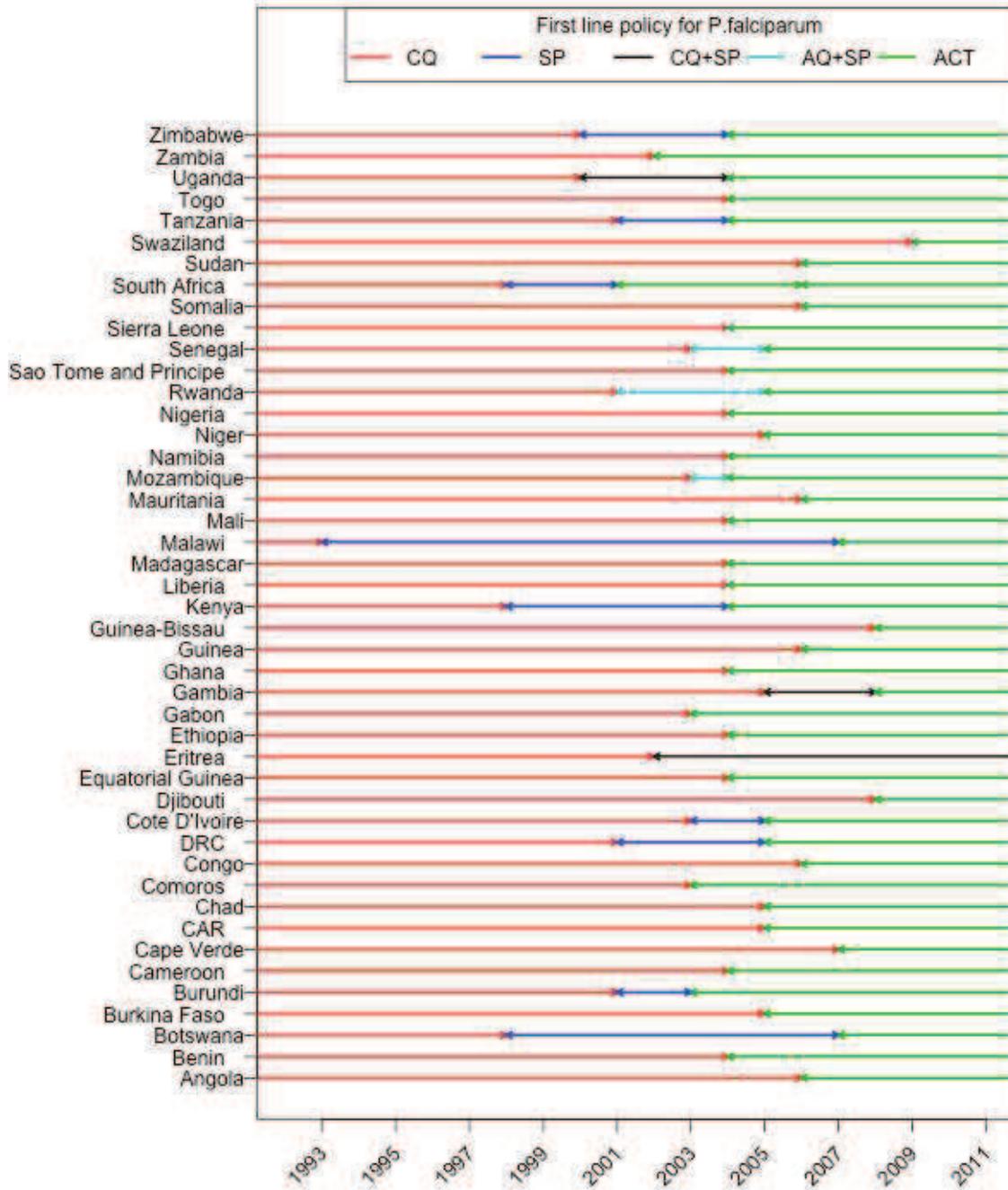
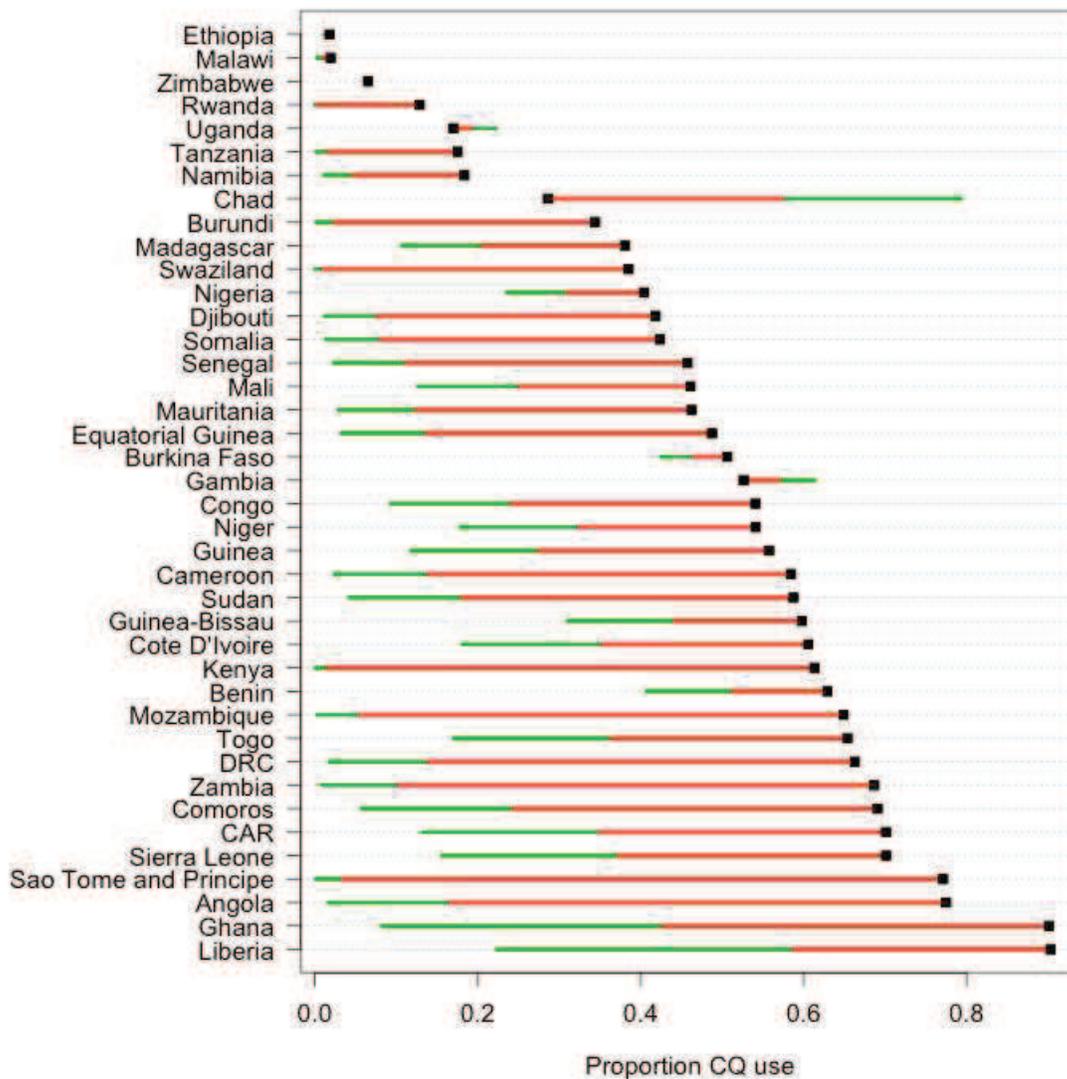


Figure 2



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

Figure 3

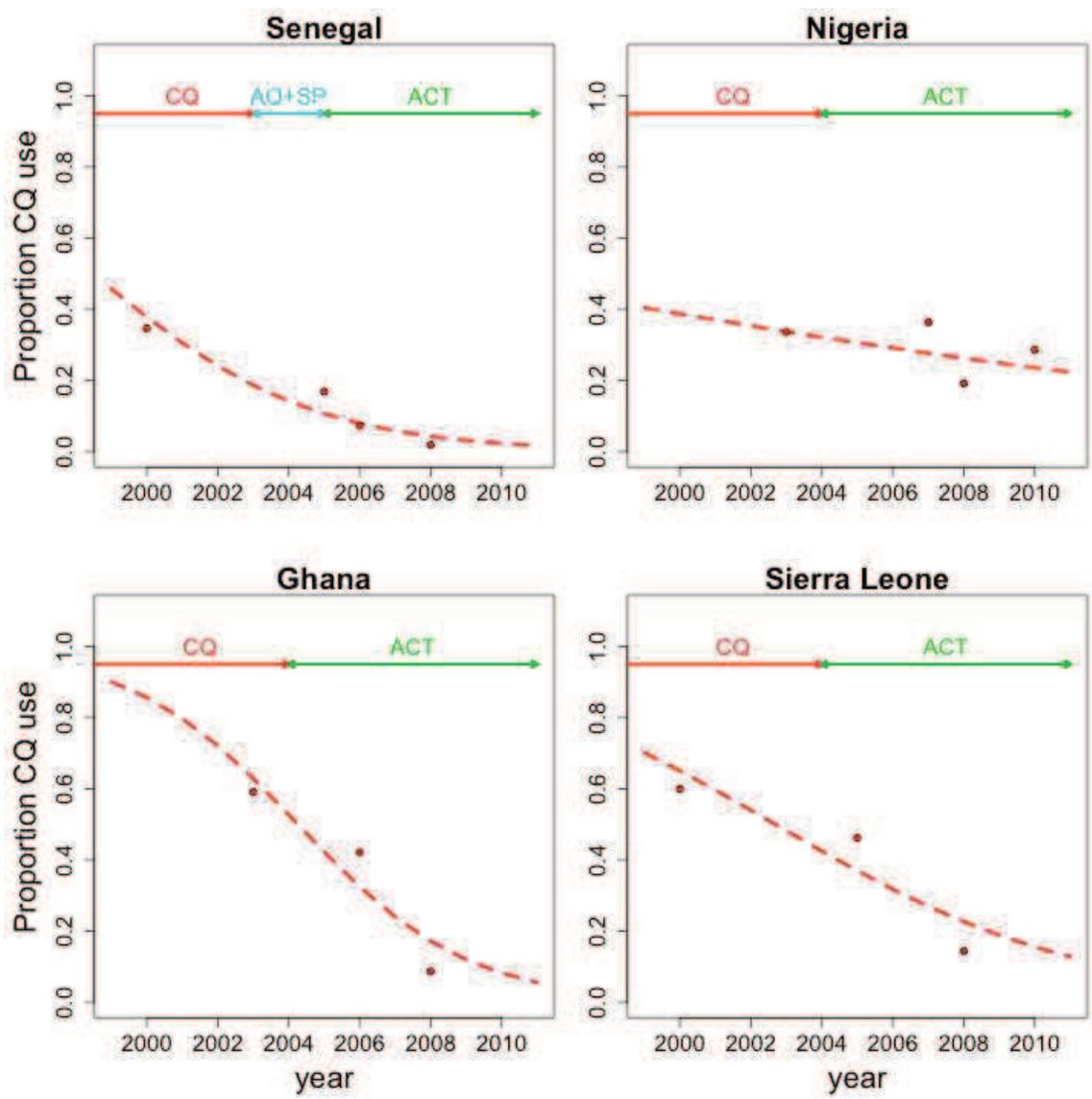
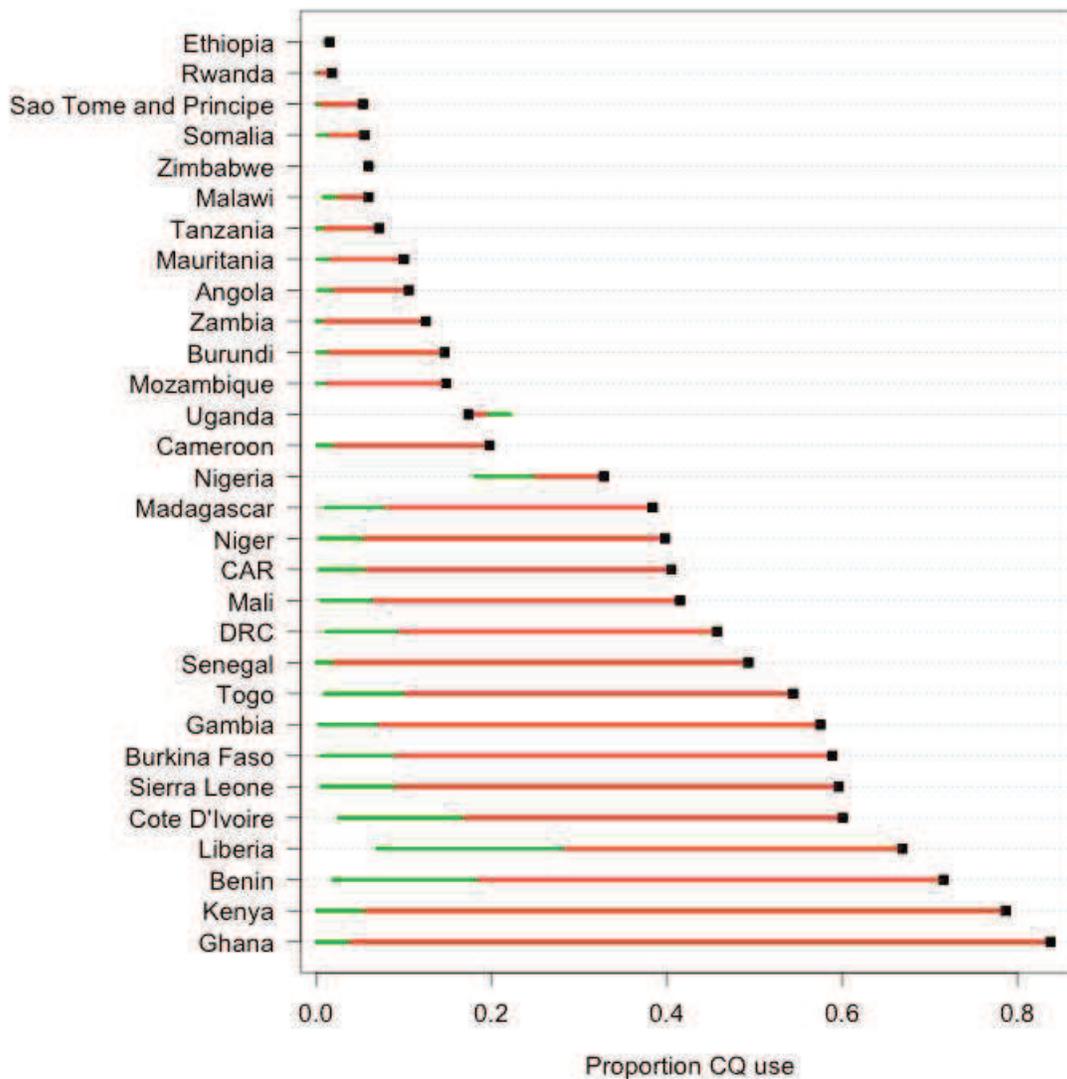


Figure 4



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

Figure 5

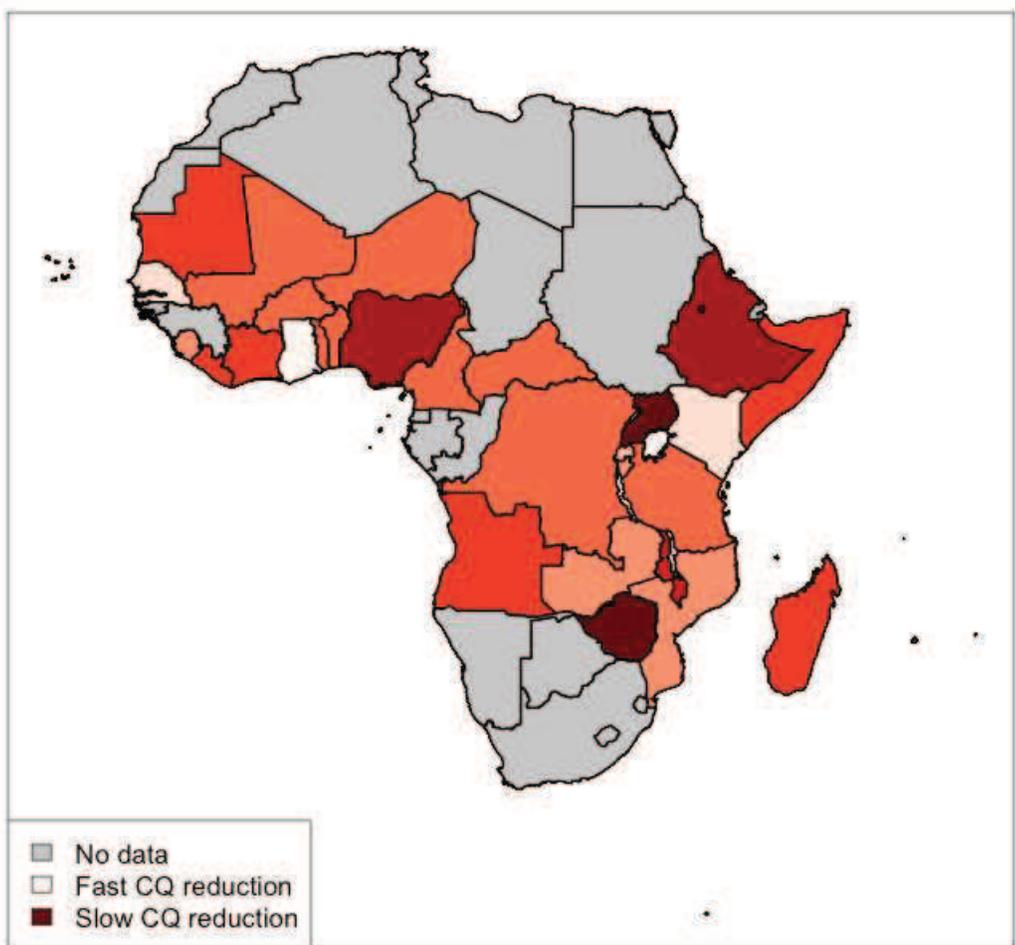
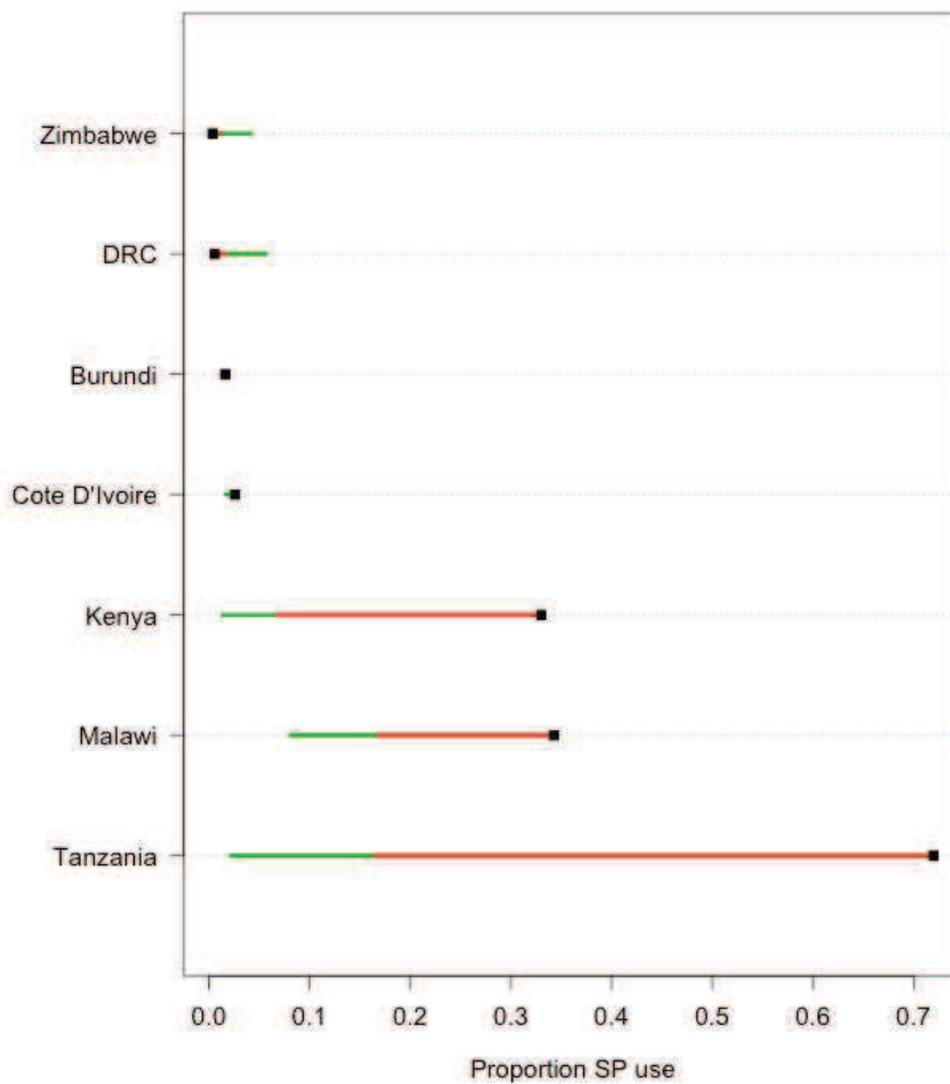


Figure 6



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

Figure 7

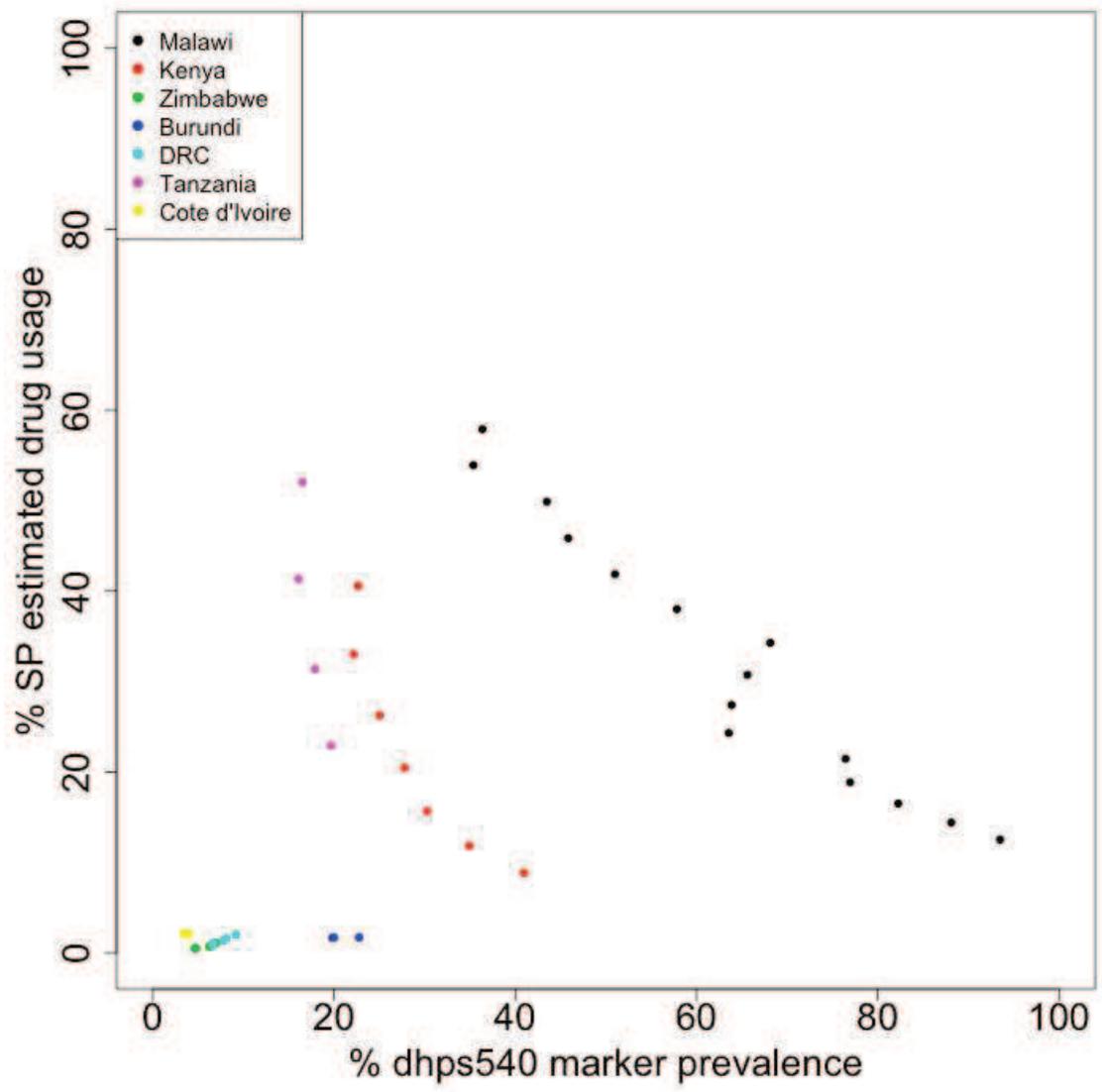


Figure 8

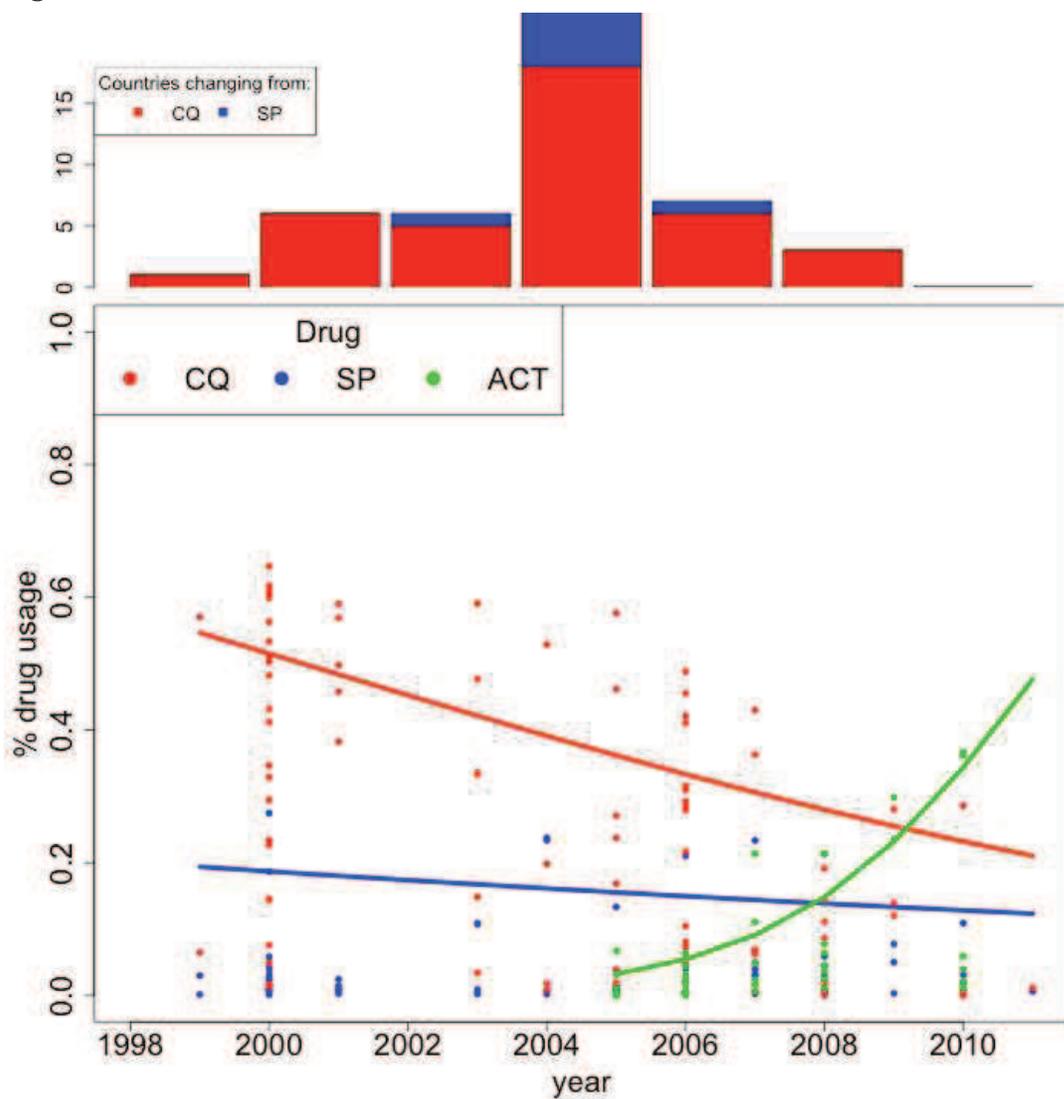


Figure legends

Figure 1: Illustration of the timing of antimalarial policy changes in Africa (see Table S1 for more details). The first line policy duration of CQ, SP, ACT, CQ+SP and AQ+SP are shown in red blue, green, light blue and black arrows, respectively. Here AQ denotes amodiaquine.

Figure 2: Country level drug use estimates from mixed effects model of CQ use where time is measured as post 1999. CQ use is represented along the horizontal axis. The intercept (that is, CQ use in 1999) is represented by the black square for each country. The red lines show the change in CQ use from 1999 to 2005 for each country (indicated by the length of the red line). The green line shows the drug use change from 2005 to 2010 (indicated by the length of the green line). The model parameter estimates, standard errors and p-values are given in Table S3. Countries are ordered by increasing level of their CQ use in 1999 as reflected by their intercept in the mixed effects model.

Figure 3: Mixed effects model predictions (red dashed line) for CQ use in Senegal (top left), Nigeria (top right), Ghana (bottom left) and Sierra Leone (bottom right). The duration of first line policies for each country is indicated by the arrows across the top of each plot. The red dots represent the observed CQ use data.

Figure 4: Country level drug use estimates from mixed effects model of CQ use where time is measured as years post the year of policy change. CQ use is represented along the horizontal axis. The intercept (that is, CQ use in the year of policy change) is represented by the black square for each country. The red lines show the change in CQ use five years post policy change for each country (indicated by the length of the red line). The green line shows the drug use change from five years to ten years post policy change (indicated by the length of the green line). Table S4 gives the model parameter estimates, standard errors and p-values. Countries are ordered by increasing level of their CQ at the time of policy change as reflected by their intercept in the mixed effects model.

Figure 5: Visualization of the rate of CQ use reduction per country, after CQ was replaced as a first line policy. The darker shades of red are indicative of a slower reduction of CQ use in a country.

Figure 6: Country level drug use estimates from mixed effects model of SP use where time is measured as post 1999. SP use is represented along the horizontal axis. The intercept (that is, SP use in 1999) is represented by the black square for each country. The red lines show the change in SP use from 1999 to 2005 for each country (indicated by the length of the red line). The green line shows the drug use change from 2005 to 2010 (indicated by the length of the green line). The model parameter estimates, standard errors and p-values are given in Table S5. Countries

are ordered by increasing level of their SP use in 1999 as reflected by their intercept in the mixed effects model.

Figure 7: *dhps540E* marker prevalence versus the estimated SP drug usage, per country, during SP first line recommendation for Malawi, (black) Kenya (red), Zimbabwe (green), Burundi (dark blue), DRC (light blue), Tanzania (pink) and Cote d'Ivoire (yellow). DRC refers to the Democratic Republic of Congo.

Figure 8: CQ (red), SP (blue) and ACT (green) usage over the time period 1999-2011 and logistic regression model fits to the data. The top subplot shows the number of countries per two year interval that changed national antimalarial policy away from CQ (red) and SP (blue).

Tables

	DHS	MICS
Number of surveys	54	38
Median year	2006	2001
Average CQ use (%)	17.0	35.9
Average SP use (%)	3.8	4.8
Total number of children	106,020	64,703
Number of countries	28	31

Table 1: Summary of DHS and MICS data included in the analysis

Country	National policy change to SP			National policy change to ACT		
	Year	SP use (%)	<i>dhps540E</i> prevalence (%)	Year	SP use (%)	<i>dhps540E</i> prevalence (%)
Malawi	1993	58	46	2007	13	96
Kenya	1998	41	31	2004	9	91
Zimbabwe	2000	<1	14	2004	1	26
Burundi	2001	2	41	2003	2	68
DRC	2001	<1	10	2005	2	33
Tanzania	2001	52	30	2004	23	71
Cote d'Ivoire	2003	2	2	2005	2	3

Table 2: Countries recommending SP for which SP usage estimates are available, year of policy changes, and estimated *dhps540E* prevalence. DRC refers to the Democratic Republic of Congo. The year of policy change to SP and later to ACT are both given, along with the estimated SP usage and *dhps540E* prevalence in each of these years. The countries are listed in order of the year of policy change to SP.

RESEARCH

Open Access

Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of *Plasmodium falciparum* in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000–2011

Myriam Gharbi^{1,2,3,4*}, Jennifer A Flegg^{5,6}, Véronique Hubert^{7,8}, Eric Kendjo^{7,9}, Jessica E Metcalf¹⁰, Lionel Bertaux^{11,12}, Philippe J Guérin^{4,5,6,13} Jacques Le Bras^{1,2,3,7,8} and Members of the French National Reference Centre for Imported Malaria Study

Abstract

Background: Chloroquine (CQ) was the main malaria therapy worldwide from the 1940s until the 1990s. Following the emergence of CQ-resistant *Plasmodium falciparum*, most African countries discontinued the use of CQ, and now promote artemisinin-based combination therapy as the first-line treatment. This change was generally initiated during the last decade in West and Central Africa. The aim of this study is to describe the changes in CQ susceptibility in this African region, using travellers returning from this region as a sentinel system.

Methods: The study was conducted by the Malaria National Reference Centre, France. The database collated the *pfcr76T* molecular marker for CQ susceptibility and the *in vitro* response to CQ of parasites from travellers' isolates returning from Senegal, Mali, Ivory Coast or Cameroon. As a proxy of drug pressure, data regarding CQ intake in febrile children were collated for the study period. Logistic regression models were used to detect trends in the proportions of CQ resistant isolates.

Results: A total of 2874 parasite isolates were genotyped between 2000–2011. The prevalence of the *pfcr76T* mutant genotype significantly decreased for Senegal (from 78% to 47%), Ivory Coast (from 63% to 37%), Cameroon (from 90% to 59%) and remained stable for Mali. The geometric mean of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of CQ *in vitro* susceptibility and the proportion of resistant isolates (defining resistance as an IC₅₀ value > 100 nM) significantly decreased for Senegal (from 86 nM (59%) to 39 nM (25%)), Mali (from 84 nM (50%) to 51 nM (31%)), Ivory Coast (from 75 nM (59%) to 29 nM (16%)) and Cameroon (from 181 nM (75%) to 51 nM (37%)). Both analyses (molecular and *in vitro* susceptibility) were performed for the 2004–2011 period, after the four countries had officially discontinued CQ and showed an accelerated decline of the resistant isolates for the four countries. Meanwhile, CQ use among children significantly decreased in this region (fixed effects slope = -0.3, $p < 10^{-3}$).

Conclusions: An increase in CQ susceptibility following official withdrawal of the drug was observed in travellers returning from West and Central African countries. The same trends were observed for molecular and *in vitro* analysis between 2004–2011 and they correlated to the decrease of the drug pressure.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Malaria, Travellers, Chloroquine, Resistance, *pfcr76*, *In vitro*, West Africa, Central Africa

* Correspondence: m.gharbi@yahoo.fr

¹Mère et enfant face aux infections tropicales, IRD unité mixte de recherche 216, Université Paris Descartes-Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, Paris Cedex 06 75270, France

²PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France

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

Background

Chloroquine (CQ) was the main malaria therapy worldwide between the 1940s and the 1990s, due to its effectiveness, safety, low cost and antipyretic properties. Resistance to CQ emerged in different locations in the late 1950s, first in Southeast Asia (Thai-Cambodian border) and in South America (Colombia and Venezuela) [1-3]. Resistance spread relatively rapidly and was detected in East Africa (Kenya and Tanzania) in the late 1970s, probably as a consequence of an importation of resistant strains from Asia [4,5]. It was first reported in West Africa in the early 1980s [6-8]. Despite evidence of a relatively high prevalence of CQ resistance in Africa for more than two decades, this single drug remained the first-line treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria recommended in most sub-Saharan African countries until the early 2000s. Consequently, a significant increase of clinical malaria morbidity and mortality in children under five years was attributable to CQ resistance from the 1980s to the 1990s [9-11]. Malawi was the first African country to change its national drug policies from CQ to sulphadoxine-pyrimethamine (SP) in 1993. In time, all malaria-endemic countries on the African continent discontinued the routine use of CQ against *P. falciparum*. The change of policy to artemisinin-based combination therapy (ACT) as first-line treatment for uncomplicated *P. falciparum* malaria occurred in all endemic countries between 2000 and 2009.

The frequency of *pfprtK76T* mutation in *P. falciparum* has been associated with clinical CQ resistance and represents a good indicator of the parasite's intrinsic resistance to CQ [12,13]. Since the withdrawal of CQ, previous studies have documented a decrease in the prevalence of CQ-resistant parasites. In East Africa, a decrease has been well described in Malawi after the CQ ban in 1993 and in Kenya after the CQ ban in 1999 [14-16]. A clinical trial conducted in Malawi in 2005 even confirmed the return of *in vivo* CQ efficacy to 99% versus less than 50% before 1993 [17]. A few studies in West Africa, particularly in Senegal, have described the same trend for CQ susceptibility after the drug was withdrawn from first-line in 2003 [18,19]. The relationship between drug pressure and trends in CQ susceptibility has been confirmed in several countries where information was available [20].

The assessment of parasites imported from malaria endemic regions is also a potential tool for monitoring malarial drug resistance; that approach has been tested in this study. It is assumed that travellers returning to non-endemic areas with malaria are infected with a wide variety of *Plasmodium* strains which partly reflect the parasite populations in the visited regions. The fact that travellers are likely to be non-immune with a low risk of re-infection also facilitates the detection of truly resistant isolates. This study describes the longitudinal changes in molecular and

in vitro correlates of CQ resistance in parasites from travellers to West and Central Africa, following the withdrawal of CQ as the recommended treatment.

Methods

Data and samples collection

The study was conducted by the National Reference Centre for Malaria (CNR), France in collaboration with the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN).

Travellers who returned to France with symptomatic *P. falciparum* infections were included in the study. Four countries, Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon, had sufficiently large numbers of returnees for meaningful comparison. Data sets from 2000 to 2011, for these countries under consideration, were included in the study. Cases originated in one of 80 hospitals participating in the French sentinel network for malaria. An imported malaria infection was defined by two factors, positive thin and thick blood smear and a recent travel history to one of the four chosen countries in the two months prior to diagnosis, without evidence of autochthonous or transfusion-related transmission. Each case was prospectively registered in the French national database after medical records were checked. Basic demographic and epidemiologic data, clinical and parasitological information, treatment, history of travel and malaria infection were collected systematically. Blood samples were collected from about half of the French hospital network, which document anti-malarial drug resistance, for molecular and *in vitro* analyses. Only samples with parasitaemia above 0.1% were analysed *in vitro*. No informed consent was required for this study as all following procedures are part of the routine French national surveillance system of malaria.

Molecular analysis

A total of 2,874 pre-treatment isolates were collected between 2000–2011. Before 2006, all the samples were systematically and prospectively analysed by the PCR-RFLP method to distinguish the *pfprt76K* from the *pfprt76T* allele related to CQ resistance [19,21]. After 2006, because of financial constraints, only 30 samples per year and per country were randomly selected for a retrospective molecular analysis. DNA was extracted from blood samples for molecular analysis using the QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen® before 2008 and the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, Roche after 2008.

In vitro assay

A total of 1,483 fresh venous blood isolates taken before treatment were centralized and tested for *in vitro* susceptibility between 2000–2011. Thin blood smears were examined to determine *P. falciparum* density and *P. falciparum* mono-infection. The batches of plates were

tested and validated on the CQ-susceptible 3D7 reference strain (Africa) and the CQ-resistant W2 reference strain (Indochina) using the standard 42-hour ^3H -hypoxanthine uptake inhibition method in controlled atmospheric conditions in the incubator (5% CO_2 , 10% O_2 and 85% N_2) [22-24]. *In vitro* isotopic microtests were performed, aliquoting 200 μl /well of the suspension of parasitized erythrocytes into 96-well plates pre-dosed with anti-malarial drugs. Radioactivity incorporated by the parasites was measured using a scintillation counter. The *in vitro* susceptibility was determined by measuring the concentration of drug required to inhibit parasite growth by 50% (50% inhibitory concentration (IC_{50})) for each of the isolates [25,26]. The IC_{50} value was calculated using the inhibitory sigmoid Emax model, with estimation of the IC_{50} through nonlinear regression [27]. Susceptibility to CQ, desethylamodiaquine, mefloquine and lumefantrine were determined, and for CQ, isolates with an IC_{50} value > 100 nM were defined as resistant [28].

Drug use

CQ usage within the four countries of interest in West and Central Africa was estimated using the data available from the demographic health surveys (DHS) and multiple indicator cluster surveys (MICS) [29,30]. DHS and MICS are nationally representative household surveys, which provide the data required for monitoring and assessing health indicators. They are conducted approximately every five years, using large sample sizes (between 5,000 and 30,000 households). Data on the number of febrile children under five years old that received CQ in the previous two weeks were extracted from 88 surveys in 40 African countries, using Measure DHS and United Nations Children's Fund (UNICEF) databases between 2000 and 2011.

Sample size calculation

In order to select eligible countries with enough data per year for significant molecular analysis, a sample size calculation, using a simple logistic regression model was used. In the model,

$$\text{logit}(P) = \beta_0 + \beta_1 X,$$

where P is the prevalence of mutant isolates and X is the time covariate, the null hypothesis H_0 : slope (β_1) = 0 was tested for one normally distributed covariate X [31]. The sample size formula for a two-sample t-test was used:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{P(1-P)(\beta^*)^2},$$

with a test significance level $\alpha = 0.05$, a power $1-\beta = 0.80$, Z_{α} the upper percentile of the standard normal distribution, the event rate at the mean of X: $P = 0.5$ and β^* the

effect size = 0.405. The total sample size required for showing a significant increase of 10% of CQ susceptibility over time was 209 patients for each country (approximately 20 patients per year for each country).

Statistical analyses

Molecular

Isolates that carried both *pfcrTK* and *pfcrTT* alleles were identified in many isolates, but the proportion of these mixed isolates proportions was constant over time, tested with a chi-square test for trend. Therefore, the prevalence of mutations at the *pfcr76T* allele was calculated as the proportion of mutant isolates (pure + mixed genotype) out of the total of all isolates (pure mutant + wild-type + mixed genotype). With this approach, the frequency of mutant alleles in the population of isolates may be over-estimated and the frequency of wild-type allele, potentially underestimated. To describe trends in the prevalence of mutant isolates through time, a logistic regression model with a logit link function was fitted to the prevalence data with time as a linear covariate for each country. Given the probability of mutant isolates, the number of mutant isolates per year was assumed to be binomially distributed.

The estimated slopes of the logistic regression curve fitted to the observed mutant allele prevalence and the 95% confidence intervals were presented in logit scale. The slopes of the changes in prevalence among the countries were extracted from the model and compared to assess whether the slopes differed significantly from null (0) and differed significantly from each other [32].

In vitro

In order to describe the temporal trends of *in vitro* data, a generalized linear model (GLM) was fitted with a log link function to IC_{50} data throughout the period 2000–2011 and after 2004:

$$\log(\text{IC}_{50}) = \alpha_0 + \alpha_1 t,$$

where t is the time covariate. It was tested whether the slope α_1 was significantly different from zero. The geometric means of the IC_{50} values per year were used to minimise the effects of outlier values. The threshold value of IC_{50} value > 100 nM was used as a definition of *in vitro* resistance to CQ [28].

Drug use

The individual patient responses from each DHS or MICS survey were aggregated to give the weighted number of positive responses to CQ use. The model was fitted using a mixed effects model for 40 different African countries to account for heterogeneity across countries. The probability P_{ij} of CQ use in country i and survey j

were given, as:

$$\text{logit}(p_{ij}) = \alpha + \beta t_j + \gamma_i + \lambda_i t_j,$$

where α is the fixed effects common intercept, β the fixed effects common slope for the time variable t_j (the year of the j th survey), γ_i the intercept random effect at the country level and λ_i the slope random effect at the country level. $\alpha + \gamma_i$ represents the country specific log-odds intercept for the i^{th} country and $\beta + \lambda_i$ the country specific log-odds slope of CQ use against time. By including the random effects components, the intercept and slope may differ from country to country. After fitting a model for CQ use across 40 African countries, results were extracted to estimate drug usage in Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon between 2000 and 2011.

Software

All statistical analyses were performed using Stata version 11 for Windows (Stata Corp, College Station, TX, USA) and R version 2.10.

Results

Travellers' characteristics

A total of 12,331 travellers infected with *P. falciparum* returned to France between 2000 to 2011 from Senegal (n = 1,970), Mali (n = 2,338), Ivory Coast (n = 4,765), and Cameroon (n = 3,258), were reported to the National Malaria Reference Centre, Paris, France (Figure 1). Of the total cases, the median age of the studied population was 31 years old, with 79% (n = 8,187) of the travellers

older than 15 years old. Mainly men were infected (61%, n = 7,546). The duration of stay was more than one month for 61% (n = 6,162) of the travellers. The purpose of travel was to visit friends and relatives (VFR) for 61% (n = 6,848), living as expatriates/residents for more than six months for 14% (n = 1,572), tourism for 13% (n = 1,484), business for 5% (n = 543); and, military posting for 4% (n = 435). Only 38% (n = 4,708) reported taking prophylaxis during their travel in the endemic country. Most cases were uncomplicated malaria (95%, n = 11,146) (Table 1). The travellers returning from the four countries presented similar characteristics.

Molecular results

The overall goal was to compare the trends in resistance, parasite susceptibility to CQ and the relationship of these values to an estimate of actual drug use in each country. From 2000 to 2011, the prevalence of the *pfprt76T* allele in parasites from patients returning from Senegal significantly decreased from 78% to 47% (slope = -0.17 , $p < 10^{-3}$); from 63% to 37% for Ivory Coast (slope = -0.15 , $p < 10^{-3}$); and, from 90% to 59% for Cameroon (slope = -0.09 , $p < 10^{-3}$) but no significant decrease of CQ-resistant isolates was observed for Mali (slope = -0.01 , $p = 0.72$) (Table 2).

By 2004, CQ use had been discontinued in all of these countries. The same analyses were repeated over the period 2004–2011. The decrease in the prevalence of the *pfprt76T* genotype was significant and faster in all cases than during the period 2000–2011. In Senegal (slope = -0.18 , $p < 10^{-3}$), Mali (slope = -0.10 , $p = 0.03$), Ivory Coast (slope = -0.27 ,

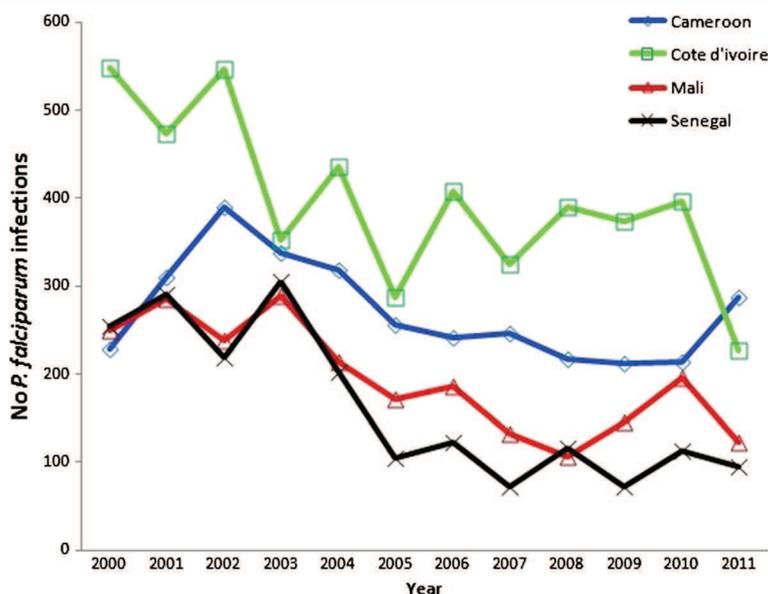


Figure 1 Imported malaria infection from West and Central Africa reported in the French Malaria Surveillance system. Number of *Plasmodium falciparum* infections diagnosed in travellers returning to France from Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon notified to the National Reference Centre for Malaria (CNRpalu), Paris, France, from 2000 to 2011.

Table 1 Characteristics of travellers returning from Senegal, Mali, Ivory Coast, Cameroon to France, 2000–2011

Travellers	Senegal (n = 1,993)*	Mali (n = 2,372)*	Ivory Coast (n = 4,778)*	Cameroon (n =3,272) *	Total (n = 12,415)
Age (year) (Median [Min-Max])	30 [0–94]	31 [0–76]	30 [0–83]	33 [0–87]	31 [0–94]
Age class, years n (%)					
≤5	78 (4)	118 (6)	349 (9)	185 (7)	730 (7)
5-15	247 (14)	339 (17)	585 (15)	307 (11)	1,478 (14)
>15	1,447 (82)	1,546 (77)	2,995 (76)	2,199 (82)	8,187 (79)
Sex					
Male n (%)	1,414 (71)	1,622 (69)	2,764 (58)	1,746 (54)	7,546 (61)
Female n (%)	572 (29)	736 (31)	1,990 (42)	1,512 (46)	4,810 (39)
Chemoprophylaxis					
No n (%)	1,113 (56)	1,182 (50)	2,485 (52)	1,993 (61)	6,773 (55)
Yes n (%)	746 (38)	959 (41)	1,955 (41)	1,048 (32)	4,708 (38)
Don't know n (%)	124 (6)	216 (9)	322 (7)	218 (7)	880 (7)
Duration of stay					
≤2 weeks n (%)	218 (13)	152 (8)	457 (12)	439 (16)	1,266 (12)
2-4 weeks n (%)	356 (21)	361 (18)	1,150 (30)	868 (33)	2,735 (27)
1-3 months n (%)	699 (41)	928 (48)	1,221 (32)	679 (25)	3,527 (35)
>3 months n (%)	428 (25)	498 (26)	1,021 (26)	688 (26)	2,635 (26)
Purpose of travel					
VFRs n (%)	1,108 (61)	1,520 (71)	2,482 (58)	1,738 (59)	6,848 (61)
Residents or expatriates ≥6 months n (%)	237 (13)	207 (9)	568 (13)	560 (19)	1,572 (14)
Tourism n (%)	322 (18)	251 (12)	514 (12)	397 (13)	1,484 (13)
Business n (%)	71 (4)	90 (4)	212 (5)	170 (6)	543 (5)
Military n (%)	24 (1)	15 (1)	368 (9)	28 (1)	435 (4)
Other n (%)	48 (3)	67 (3)	142 (3)	68 (2)	325 (3)
Severe malaria					
No n (%)	1,834 (93)	2,235 (95)	4,513 (95)	3,064 (95)	11,146 (95)
Yes n (%)	136 (7)	123 (5)	225 (5)	177 (5)	661 (5)
No <i>pfprt76</i> analyses	594	701	860	719	2874
No <i>In vitro</i> analyses for CQ	305	396	729	513	1483

*Numbers may not add to totals because of missing values.

$p < 10^{-3}$) and Cameroon (slope = -0.11 , $p < 10^{-3}$) the prevalence decreased (Figure 2). When the mixed genotype isolates were removed from the analyses, the same trends were observed. To compare these trends with those from other regions, published data sets of similar molecular data from Kenya and Malawi, after CQ withdrawal, were accessed and the logistic regression model fitted to these data [14,16]. The slopes of the prevalence of *pfprt76T* were strongly negative: Malawi, 1993–2000 (slope = -0.25 , $p < 10^{-3}$) and Kenya, 1999–2006 (slope = -0.20 , $p = 0.003$) (Figure 2). However, comparison of the slopes showed no significant differences among the six countries ($p = 0.22$).

***In vitro* results**

A second way of assessing changes in CQ susceptibility was to measure the response of isolates *in vitro*. From 2000 to 2011, the geometric mean of the IC₅₀ of CQ of

the isolates tested *in vitro* by the ³H-hypoxanthine uptake inhibition method decreased significantly in each country. In Senegal, the value decreased from 86 nM (95% confidence interval [95% CI], 51–145, 59% resistant) to 38 nM (95% CI, 25–59, 25% resistant); from 84 nM (95% CI, 35–198, 50% resistant) to 51 nM (95% CI, 36–73, 31% CQ resistant) in Mali; from 75 nM (95% CI, 43–130, 59% resistant) to 30 nM (95% CI, 22–40, 16% resistant) in Ivory Coast and from 181 nM (95% CI, 87–374, 75% resistant) to 50 nM (95% CI, 36–69, 37% resistant) in Cameroon (Table 2).

Constraining the analyses over the period 2004–2011 resulted in an even faster decrease of *in vitro* susceptibility for CQ for the four African countries: Cameroon (slope = -0.10 , $p < 10^{-3}$), Ivory Coast (slope = -0.12 , $p < 10^{-3}$), Mali (slope = -0.10 , $p < 10^{-3}$) and Senegal (slope = -0.12 , $p < 10^{-3}$) (Figure 3A, Table 2).

Table 2 Trends in molecular genotypes and *in vitro* susceptibility for *P. falciparum* isolates

	Slopes of prevalence in <i>Pfcr76T</i>			
	2000-2011		2004-2011	
	Slope (95% CI)	P value	Slope (95% CI)	P value
Senegal	-0.167 [-0.209; -0.125]	<10 ⁻³	-0.182 [-0.264; -0.102]	<10 ⁻³
Mali	-0.009 [-0.052; 0.034]	0.72	-0.102 [-0.178; -0.027]	0.03
Ivory Coast	-0.146 [-0.183; -0.111]	<10 ⁻³	-0.265 [-0.325; -0.207]	<10 ⁻³
Cameroon	-0.090 [-0.130; -0.050]	<10 ⁻³	-0.106 [-0.172; -0.041]	<10 ⁻³

	Slopes of IC ₅₀ values for CQ			
	2000-2011		2004-2011	
	Slope (95% CI)	P value	Slope (95% CI)	P value
Senegal	-0.081 [-0.130; -0.032]	<10 ⁻³	-0.123 [-0.220; -0.026]	<10 ⁻³
Mali	-0.042 [-0.090; 0.007]	0.02	-0.098 [-0.167; -0.030]	<10 ⁻³
Ivory Coast	-0.057 [-0.093; -0.021]	<10 ⁻³	-0.120 [-0.177; -0.063]	<10 ⁻³
Cameroon	-0.055 [-0.089; -0.020]	<10 ⁻³	-0.100 [-0.154; -0.046]	<10 ⁻³

Slopes of prevalence in *Pfcr76T* and slopes of IC₅₀ values from patients returning to France from Senegal, Mali, Ivory Coast, and Cameroon, between 2000–2011 and 2004–2011 (after CQ withdrawal).

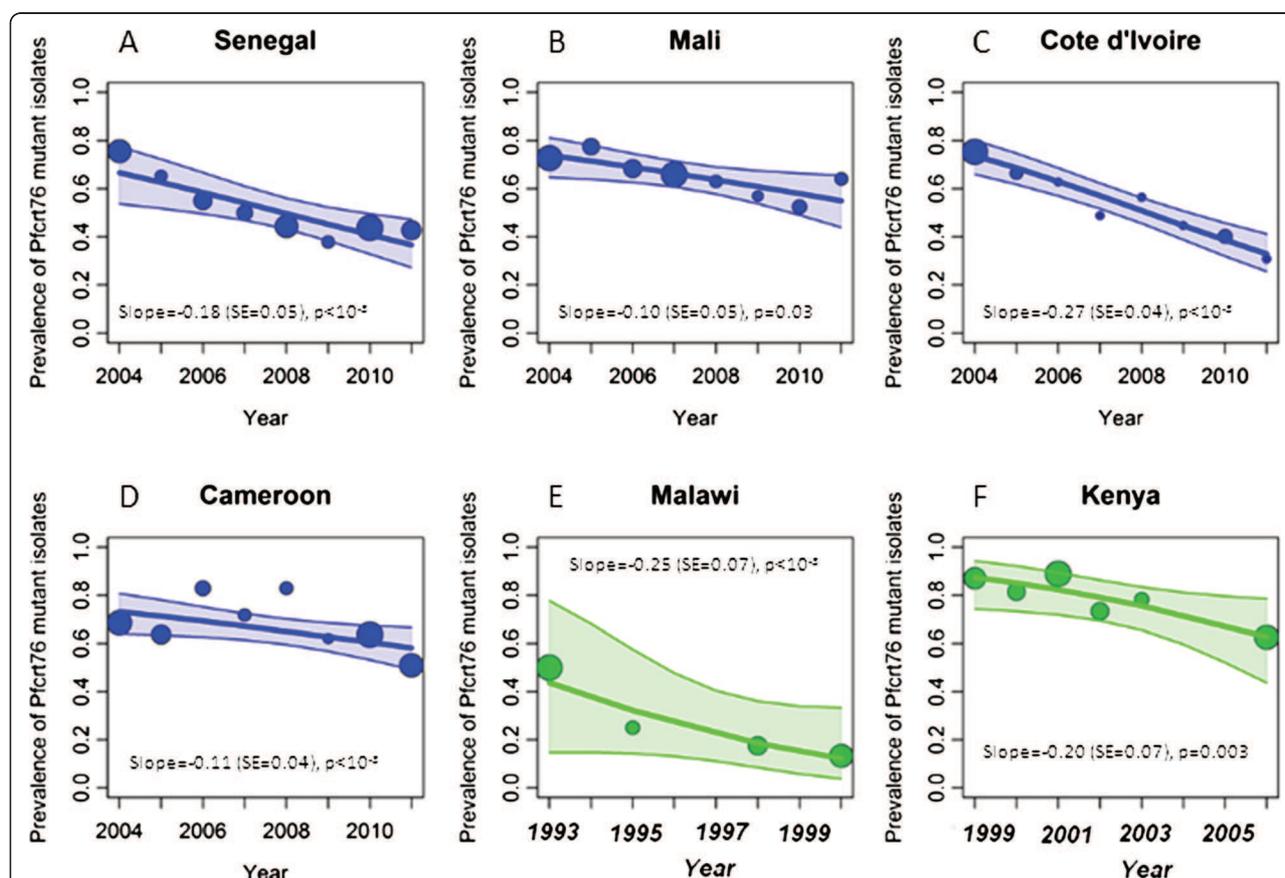
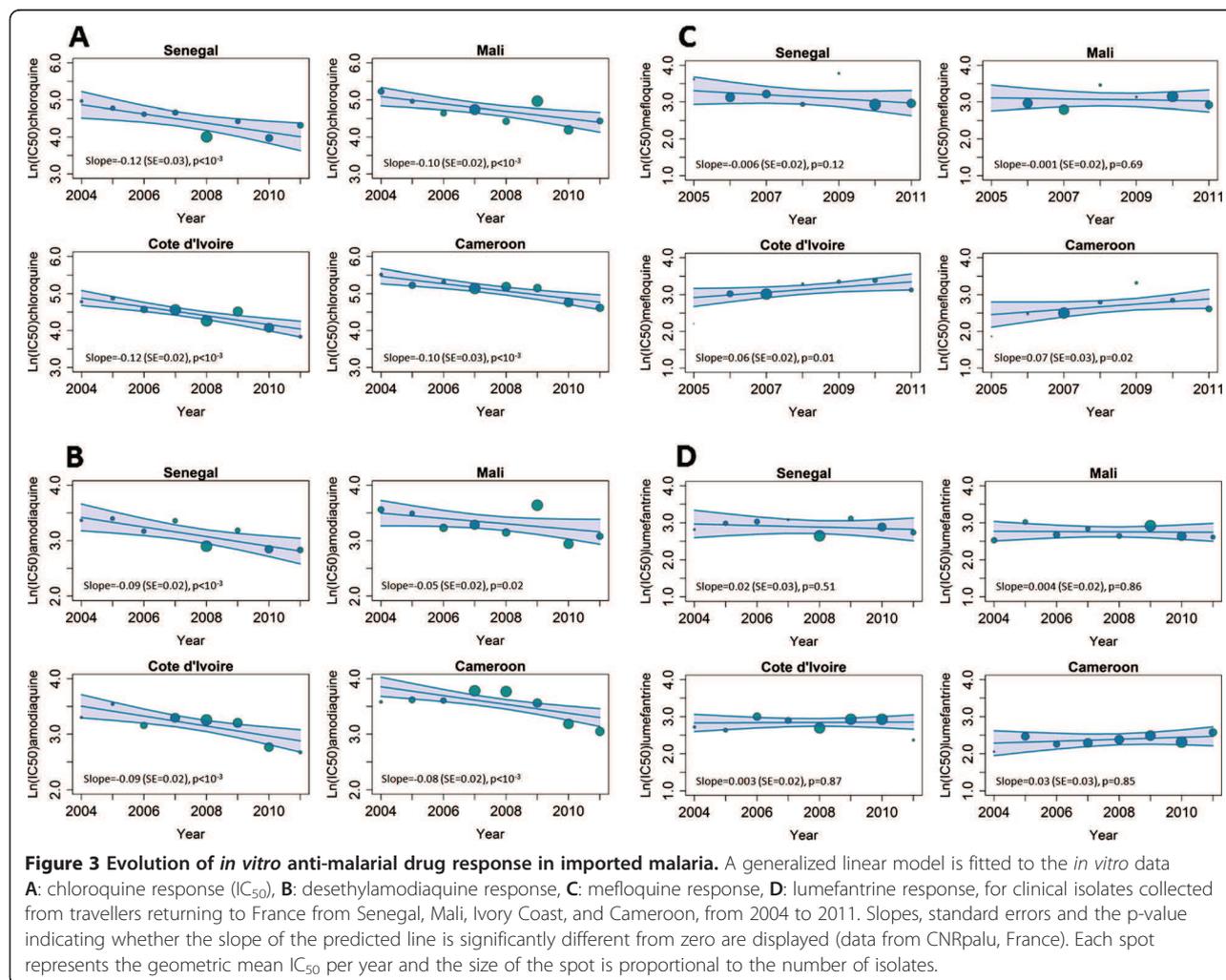


Figure 2 Evolution of the prevalence of *pfcr76T* isolates after the CQ ban in different African regions. Observed and fitted (by logistic regression) prevalence of *pfcr76T* mutant isolates and 95% Confidence Interval, from travellers returning to France from **A**) Senegal, **B**) Mali **C**) Ivory Coast, and **D**) Cameroon, from 2004 to 2011, after that most African countries officially banned the use of CQ. The slopes and their standard error are displayed for each country. Each spot represents the number of isolates per year for travellers' data and per study for field studies. The size of the spot is proportional to the number of isolates. The p-value indicates whether the slope of the predicted line is significantly different from zero (data from CNRpalu, France). These data are compared with two field studies **E**) in Malawi and **F**) Kenya after the CQ ban (1993 for Malawi and 1999 for Kenya) [14,16].



Susceptibility to other anti-malarial drugs, i.e., amodiaquine, mefloquine and lumefantrine was also examined as they are components of artemisinin combination therapy currently in use. Moreover, some *in vitro* studies have suggested that there is cross-resistance between amodiaquine and CQ because of their similar chemical structure [33]. Mefloquine and lumefantrine belong to the amino-alcohol class and some *in vitro* studies have also suggested an inverse relationship between the responses of CQ and amino-alcohols [34,35]. The *in vitro* responses of isolates for these other drugs were also determined for the period 2004–2011. The geometric mean of the IC_{50} values for desethylamodiaquine (active metabolite of amodiaquine) showed a significant decline in each of the four countries (Figure 3B). Susceptibility to mefloquine showed an increasing trend in Ivory Coast and Cameroon, but the values were stable in Senegal and Mali (Figure 3C). In contrast, the susceptibility *in vitro* to lumefantrine was stable in all four countries (Figure 3D).

The *in vitro* and molecular methods are indirect indicators of parasite resistance to anti-malarial drugs, but allow efficient longitudinal and temporal surveillance of any changes. In particular, these approaches have been used to track the trends in resistance following the change from CQ to other drugs as recommended first line therapies [14,16,36]. The actual drug use in a country is, of course, a key parameter in such changes. To examine these trends, the drug use data were extracted from DHS and MICS surveys in the four target countries, applying a mixed effects model. The percentage usage of CQ in children with fever in 88 surveys from 40 African countries showed the general decrease in use from 2000 to 2011 (fixed effects slope = -0.3 , $p < 10^{-3}$; random effects slope = 0.076 , $p < 10^{-3}$). The significant decrease during this period was more specifically observed in Senegal, from 38% to 2% (slope = -0.33 , $p < 0.01$); from 42% to 13% in Mali (slope = -0.16 , $p < 0.01$); from 56% to 18% in Ivory Coast (slope = -0.18 , $p < 0.01$);

and from 49% to 2% in Cameroon (slope = -0.37, $p < 0.01$), after extracting results from the mixed effects model.

Using these estimates of trends in CQ use, there was a positive correlation between CQ use and prevalence of the *pfprt76T* allele in Senegal ($r^2 = 0.79$, $p < 0.01$) and Ivory Coast ($r^2 = 0.74$, $p < 0.01$) but not in Mali ($r^2 = 0.18$, $p = 0.57$) or Cameroon ($r^2 = 0.45$, $p = 0.14$) (Figure 4).

Discussion

The present study suggested a progressive return of CQ susceptibility in four countries of West and Central Africa, i.e., Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon, based on the surveillance of patients returning to non-endemic areas with *P. falciparum* infection from 2000–2011. These results, from both molecular and *in vitro* analyses, show that CQ resistance was in decline during this period, except in Mali. The same analyses performed for the period 2004–2011, after these countries had changed their national recommendations from CQ to alternative anti-malarial drugs, confirm the increase of CQ susceptibility and show an accentuated trend compared to the period 2000–2011, in Senegal, Ivory Coast and Cameroon. A significant decrease of CQ resistance was observed in Mali only after 2004.

The conclusions from these indirect measures of CQ efficacy in travellers are consistent with similar measures assessed in the field. For Senegal, the prevalence of *pfprt76T* isolates in travellers showed a similar trend as

observed in two studies conducted in Dakar, but a different trend from a study conducted in the city of Pikine, located 15 km from Dakar [18,19,37]. These results are also consistent with the East African countries, Malawi and Kenya, where the return of CQ susceptibility was observed following the official withdrawal of this drug. Indeed, the prevalence of *pfprt76T* mutant isolates in travellers is comparable with previously published data from the field in East Africa after the CQ ban and similar trends are described (Figure 2).

Although the trends are similar, there are variations among the countries in the trends and many factors are likely to explain these. Overall, the main factor is the efficiency with which new drug policies are implemented. This is, in turn, strongly influenced by the political, economic, geographic, social and cultural contexts within each country and region. The pharmaceutical distribution modes and drug supply chains impact the use of drugs, depending on the level of control that the government exercises over the pharmaceutical distribution system in the public and private sectors [38,39]. For example, Malawi, which implemented successful national information campaigns and efficient control of its distribution, was able to almost completely ban CQ use and show, after 10 years, a complete recovery of the CQ susceptibility [40]. In addition, overall malaria prevalence the distance between patients and public health facilities, and socio-economic level, age of patients and have also been identified as key factors for CQ use

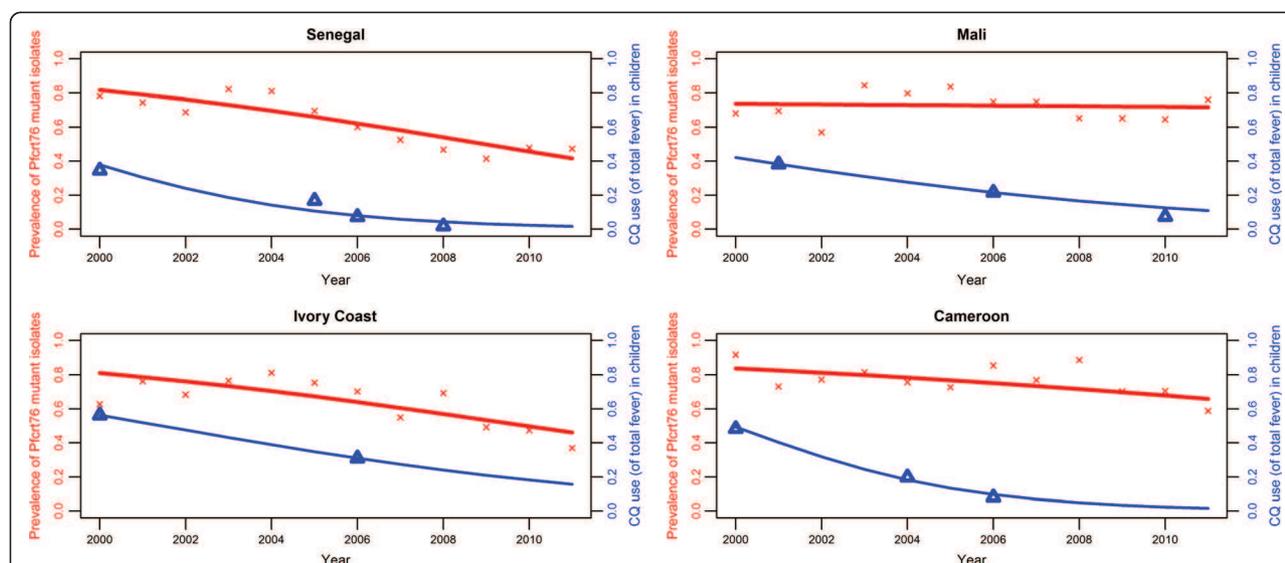


Figure 4 Evolution of the prevalence of *pfprt76* mutant isolates regarding the change in drug use, 2000–2011. The Y-axis represents the observed (red crosses) and fitted (by logistic regression, red line) prevalence of *pfprt76* mutant isolates from travellers returning to France from Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon, from 2000 to 2011 (data from CNRpalu, France). The X-axis represents observed (blue upward triangle) and fitted (by logistic regression using linear mixed model, blue line) prevalence of CQ use among fever in children under five years-old with fever in Senegal, Mali, Ivory Coast and Cameroon, from 2000 to 2011 (data from Demographic Health Survey and Multiple Indicator Cluster Survey).

[41,42]. In the West African region, migration of people carrying parasites displaced from other regions is also a potentially important factor. Deeper analysis in countries that differ greatly in the response to withdrawal of a drug will help to quantify the influence of these factors.

Despite the disparate influences, the overall effectiveness of drug policy implementation has important and far-reaching effects on the useful therapeutic life of anti-malarial drugs by delaying the emergence of resistance.

Most important, following the emergence of resistance, the time between official policy changes and their subsequent implementation, directly impacts public health; use of poorly effective drugs increases malaria mortality and morbidity [10,11]. This consequence has been confirmed in some studies which reported the decrease in the proportion of severe malaria cases and in malaria-specific mortality after the introduction or distribution of free ACT [43-45].

The trends of CQ use, which were estimated using DHS and MICS data, show a steady decrease for the four countries of interest without major differences among them. However, the slow decrease in the prevalence of the *pfcr76T* allele observed in Mali might be partly explained by the relatively slow decrease of CQ consumption illustrated in Figure 4. The reversal from high prevalence of the resistant mutant genotype *pfcr76T* within the parasite population to the wild type genotype *pfcr76K* might be explained by the fitness cost of the resistant mutant: there is evidence that the parasites that carry the wild type *pfcr76K* allele have a survival advantage in the absence of drug pressure [40]. However, the positive correlation between CQ use and prevalence of CQ resistance was only shown for Senegal and Ivory Coast. Beyond country-specific drug policies and efficacies in implementing them, other factors may also play a role in differences between countries. For example, transmission intensity, which differs between sites, might impact the CQ use and therefore, the prevalence of mutant isolates. This is observed with reversion back to the 76 K haplotype occurring during low transmission seasons [46,47]. Multiple first-line therapies or cycling strategies, where anti-malarial therapies are rotated, might be one of the tools to decrease drug pressure and help prevent the spread of resistance [48].

The four West and Central African countries currently recommend the combination of artesunate-amodiaquine as first-line treatment [49]. In addition to the recommended first-line drugs, many other anti-malarials are commonly used in these countries and selection pressures on the *pfcr* locus are complex. In Southeast Asia, addition of artesunate to mefloquine was followed by a partial reversal of mefloquine resistance [50,51].

Amodiaquine is closely related to CQ, and was also used considerably in these four countries. The change

from monotherapy with amodiaquine in combination with artesunate may have provided reciprocal protection to the artemisinin derivative and to the partner drug influenced the return of amodiaquine and CQ susceptibility. It is, therefore, possible that the significant decrease of IC_{50} for desethylamodiaquine might be explained both by the decrease of CQ-resistant isolates and the switch from amodiaquine monotherapy to artesunate-amodiaquine combination therapy in West and East African region after 2006. The decrease of *in vitro* mefloquine susceptibility in Cameroon and Ivory Coast may have selected CQ-susceptible isolates. Indeed, the inverse correlation between CQ and mefloquine, which was described in previous studies, could explain the opposite trend [35,52].

The present study has several limitations worth noting. Returning travellers are not a representative sample of the native population and the precise location within the country where infection occurred is not reported. However, trends for *in vitro* and molecular results for imported malaria are similar to those observed in previous publications from Senegal [18,19]. For validation of this approach, these results should be compared to country-level *in vitro* and molecular data analysed in the same conditions for the four countries. There are also some limitations and bias regarding the consumption data. The CQ use in children under five years old with fever is used as a proxy of the CQ consumption in the country. The data are only based on the mother's declaration and do not assess directly the blood drug concentration. This approach is less reliable than biological methods because of misunderstanding of questions, failed memory or deliberate attempts to provide false information [53].

Emergence of resistance to artemisinin has also been confirmed recently in different loci in Southeast Asia [54,55]. This raises concerns about the potential spread of this resistance in sub-Saharan Africa, as has been previously described for other anti-malarial drugs. Effective surveillance systems to monitor anti-malarial drug resistance in Africa are essential to protect the efficacy of ACT. So, despite the limitations, surveillance of parasites from travellers can be used to monitor the evolution of resistance over time, and can provide useful information, especially from areas where little information is available. Those data can be realised rapidly and methods can be more easily standardized. This non-immune population, unlikely to be re-infected, also facilitates detection of resistant isolates and true clinical failure.

Conclusions

The longitudinal pattern of CQ resistance in four West and Central African countries using travellers' data was described and the CQ withdrawal after policy change

may have accelerated the return of CQ susceptibility. The length of time between policy changes and their subsequent implementation, as well as the use of analogue anti-malarial drugs, may affect the time for a significant recovery of CQ sensitivity. Despite the regain of CQ susceptibility, any reintroduction would likely to result in a rapid re-emergence of resistance strains [56]. This study highlights the correlation between drug pressure and resistance prevalence [57]. The rapidly evolving pattern of anti-malarial drug resistance in endemic countries emphasises the need for a sustainable surveillance system, which would enable the implementation of more longitudinal studies.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MG, PJG and JL conceived and designed the study and interpreted the results; MG conducted the research and wrote the manuscript; MG and JAF performed the statistical analysis; VH and LB carried out the biological analysis; EK was responsible for the travellers' surveillance database; JEM participated in the collection of drug use data; PJG and JL supervised the manuscript; the CNR study group participated in samples and data collection. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study.

Ahmed Aboubacar, Patrice Agnamey, Adela Angoulvant, Patricia Barbut, Didier Basset, Ghania Belkadi, Anne Pauline Bellanger, Dieudonné Bemba, Françoise Benoit-Vical, Antoine Berry, Marie-Laure Bigel, Julie Bonhomme, Françoise Botterel, Olivier Bouchaud, Marie-Elisabeth Bougnoux, Patrice Bourée, Nathalie Bourgeois, Catherine Branger, Laurent Bret, Bernadette Buret, Enrique Casalino, Sylviane Chevrier, Frédérique Conquere de Monbrison, Bernadette Cuisenier, Martin Danis, Marie-Laure Darde, Ludovic De Gentile, Jean-Marie Delarbre, Pascal Delaunay, Anne Delaval, Guillaume Desoubeaux, Michel Develoux, Jean Dunand, Rémy Durand, Odile Eloy, Nathalie Fauchet, Bernard Faugere, Albert Faye, Odile Fenneteau, Pierre Flori, Madeleine Fontrouge, Chantal Garabedian, Françoise Gayandrieu, Nadine Godineau, Pascal Houzé, Sandrine Houzé, Jean-Pierre Hurst, Houria Ichou, Laurence Lachaud, Agathe Lebuissou, Magalie Lefevre, Anne-Sophie Le Guern, Gwenaél Le Moal, Daniel Lusina, Marie-Claude Machouart, Denis Malvy, Sophie Matheron, Danièle Maubon, Denis Mechali, Bruno Megarbane, Guillaume Menard, Laurence Millon, Muriel Mimoun Aïach, Philippe Minodier, Christelle Morelle, Gilles Nevez, Philippe Parola, Daniel Parzy, Olivier Patey, Pierre Patoz, Pascale Penn, Alice Perignon, Stéphane Picot, Jean-Etienne Pilo, Isabelle Poilane, Denis Pons, Marie Poupard, Bruno Pradines, Didier Raffenot, Christophe Rapp, Marie-Catherine Receveur, Claudine Sarfati, Yaye Senghor, Fabrice Simon, Jean-Yves Siriez, Nicolas Taudon, Marc Thellier, Maxime Thouvenin, Dominique Toubas.

Acknowledgements

We thank Prof Carol Sibley for critical reading of the manuscript. Data for Measure DHS was obtained thanks to USAID and data for MICS was obtained thanks to UNICEF. This study was supported in part by a grant for doctoral studies to M Gharbi from the Doctoral Network of the École des Hautes Études en Santé Publique, Rennes, France and a grant for CNRpaludisme from Institut national de Veille Sanitaire, St Maurice, France.

Author details

¹Mère et enfant face aux infections tropicales, IRD unité mixte de recherche 216, Université Paris Descartes-Paris V, 4 avenue de l'Observatoire, Paris Cedex 06 75270, France. ²PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France. ³WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN), Paris, France. ⁴EHESP Rennes, Sorbonne, Paris Cité, France. ⁵WWARN, Oxford, UK. ⁶Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine,

CCVTM, University of Oxford, Oxford, UK. ⁷Centre National de Référence du Paludisme, Paris, France. ⁸Service de Parasitologie Mycologie, CHU Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France. ⁹Service de Parasitologie Mycologie, CHU Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France. ¹⁰Epidemiology and Infectious Diseases, Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK. ¹¹Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France. ¹²Unité de Recherche en Physiologie et Pharmacocinétique Parasitaires - UMR-MD3 Relations Hôte-Parasites - Pharmacologie et Thérapeutique, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France. ¹³UMR S 707: Epidemiology, Information Systems, Modelling, INSERM and Université Pierre et Marie-Curie -Paris, Paris, France.

Received: 11 October 2012 Accepted: 19 January 2013

Published: 25 January 2013

References

1. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C: **Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand.** *Lancet* 1965, **2**:657-660.
2. Moore DV, Lanier JE: **Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine.** *Am J Trop Med Hyg* 1961, **10**:5-9.
3. Young MD, Moore DV: **Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 1961, **10**:317-320.
4. Kihamia CM, Gill HS: **Chloroquine-resistant falciparum malaria in semi-immune African Tanzania.** *Lancet* 1982, **2**:43.
5. Fogh S, Jepsen S, Effersoe P: **Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979, **73**:228-229.
6. Kyrönseppä H, Lumio J, Ukkonen R, Pettersson T: **Chloroquine-resistant malaria from Angola.** *Lancet* 1984, **1**:1244.
7. Sansonetti PJ, Lebras C, Verdier F, Charmot G, Dupont B, Lapresle C: **Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon.** *Lancet* 1985, **1**:1154-1155.
8. Hellgren U, Ardal OK, Lebbad M, Rombo L: **Is chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria emerging in Senegal or The Gambia?** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987, **81**:728.
9. Korenromp EL, Williams BG, Gouws E, Dye C, Snow RW: **Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy.** *Lancet Infect Dis* 2003, **3**:349-358.
10. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrees Du Lou A, Delaunay V, Samb B, Lagarde E, Molez JF, Simondon F: **Impact of chloroquine resistance on malaria mortality.** *C R Acad Sci III* 1998, **321**:689-697.
11. Trape JF: **The public health impact of chloroquine resistance in Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**(1-2 Suppl):12-17.
12. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Coulibaly D, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV: **A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria.** *N Engl J Med* 2001, **344**:257-263.
13. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE: **Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance.** *Mol Cell* 2000, **6**:861-871.
14. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV: **Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi.** *J Infect Dis* 2003, **187**:1870-1875.
15. Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, Tsukahara T, Tanabe K, Kobayakawa T, Bjorkman A: **Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:413-415.
16. Mwai L, Ochong E, Abdurahman A, Kiara SM, Ward S, Kokwaro G, Sasi P, Marsh K, Borrmann S, Mackinnon M, Nzila A: **Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya.** *Malar J* 2009, **8**:106.
17. Lauffer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalimala FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV: **Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi.** *N Engl J Med* 2006, **355**:1959-1966.
18. Ndiaye M, Faye B, Tine R, Ndiaye JL, Lo A, Abiola A, Dieng Y, Ndiaye D, Hallett R, Alifrangis M, Gaye O: **Assessment of the molecular marker of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance (PfCRT) in Senegal after**

- several years of chloroquine withdrawal. *Am J Trop Med Hyg* 2012, **87**:640–645.
19. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Fall F, Diémé Y, Rogier C, Bercion R, Briolant S, Wade B, Pradines B: **Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal.** *Malar J* 2012, **11**:197.
 20. 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.
 21. Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, Le Bras J: **Analysis of pfcr1 point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **114**:95–102.
 22. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD: **Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique.** *Antimicrob Agents Chemother* 1979, **16**:710–718.
 23. Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J: **Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:3343–3349.
 24. de Waal HA D-V, De Waal F: **Een tweede patiënt met malaria tropica op natuurlijke wijze verkregen in Nederland.** *Ned Tijdschr Geneesk* 1981, **125**:375–377.
 25. Basco L: *Field Application of In vitro Assays for the Sensitivity of Human Malaria Parasites to Antimalarial Drugs.* Geneva: World Health Organization; 2007:1–202.
 26. Pradines B, Hovette P, Fusai T, Atanda HL, Baret E, Cheval P, Mosnier J, Callec A, Cren J, Amalvict R, Gardair JP, Rogier C: **Prevalence of in vitro resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2404–2408.
 27. Le Nagard H, Vincent C, Mentre F, Le Bras J: **Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression.** *Comput Methods Programs Biomed* 2011, **104**:10–18.
 28. Basco LK, Ndounga M, Keundjian A, Ringwald P: **Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. IX. Characteristics of recrudescence and persistent *Plasmodium falciparum* infections after chloroquine or amodiaquine treatment in children.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:117–123.
 29. *Multiple Indicator Cluster Survey, United Nations Children's Fund.* www.childinfo.org.
 30. *Measure DHS, ICF Macro.* www.measuredhs.com.
 31. Hsieh FY, Bloch DA, Larsen MD: **A simple method of sample size calculation for linear and logistic regression.** *Stat Med* 1998, **17**:1623–1634.
 32. Armitage P: *Statistical Methods in Medical Research.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1980.
 33. Basco LK, Ringwald P: **Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXIV. Trends of in vitro antimalarial drug responses in Yaounde, Cameroon.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:20–26.
 34. Basco LK, Le Bras J: **In vitro activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:301–307.
 35. Simon F, Le Bras J, Gaudebout C, Girard PM: **Reduced sensitivity of *Plasmodium falciparum* to mefloquine in West Africa.** *Lancet* 1988, **1**:467–468.
 36. Fall B, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Fall F, Dieme Y, Rogier C, Wade B, Bercion R, Pradines B: **Ex vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, to seven standard anti-malarial drugs.** *Malar J* 2011, **10**:310.
 37. Ly O, Gueye PE, Deme AB, Dieng T, Badiane AS, Ahouidi AD, Diallo M, Bei AK, Wirth DF, Mboup S, Sarr O: **Evolution of the pfcr1 T76 and pfmdr1 Y86 markers and chloroquine susceptibility 8 years after cessation of chloroquine use in Pikine, Senegal.** *Parasitol Res* 2012, **111**:1541–1546.
 38. Talisuna AO, Adibaku S, Amojah CN, Amofah GK, Aubyn V, Dodo A, Juma E, Jackou DH, Mkude S, Okui AP, Ramarosandratana B, Shija SJ: **The affordable medicines facility-malaria-A success in peril.** *Malar J* 2012, **11**:370.
 39. Tougher S, Ye Y, Amuasi JH, Kourgueni IA, Thomson R, Goodman C, Mann AG, Ren R, Willey BA, Adegoke CA, Amin A, Ansong D, Bruxvoort K, Diallo DA, Diap G, Festo C, Johanes B, Juma E, Kalolella A, Malam O, Mberu B, Ndiaye S, Nguah SB, Seydou M, Taylor M, Rueda ST, Wamukoya M, Arnold F, Hanson K: **Effect of the Affordable Medicines Facility-malaria (AMFm) on the availability, price, and market share of quality-assured artemisinin-based combination therapies in seven countries: a before-and-after analysis of outlet survey data.** *Lancet* 2012, **380**:1916–1926.
 40. Laufer MK, Plowe CV: **Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies.** *Drug Resist Updat* 2004, **7**:279–288.
 41. Baxerres C, Le Hesran JY: **Where do pharmaceuticals on the market originate? An analysis of the informal drug supply in Cotonou.** *Benin. Soc Sci Med* 2011, **73**:1249–1256.
 42. Gardella F, Assi S, Simon F, Bogreau H, Eggelte T, Ba F, Fournane V, Henry MC, Kientega PT, Basco L, Trape JF, Lalou R, Martelloni M, Desbordes M, Baragatti M, Briolant S, Almeras L, Pradines B, Fusai T, Rogier C: **Anti-malarial drug use in general populations of tropical Africa.** *Malar J* 2008, **7**:124.
 43. Lemma H, Byass P, Desta A, Bosman A, Costanzo G, Toma L, Fottrell E, Marrast AC, Ambachew Y, Getachew A, Mulure N, Morrone A, Bianchi A, Barnabas GA: **Deploying artemether-lumefantrine with rapid testing in Ethiopian communities: impact on malaria morbidity, mortality and healthcare resources.** *Trop Med Int Health* 2010, **15**:241–250.
 44. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, Khatib R, Al-Mafazy AW, Ramsan M, Rotllant G, Gerste nMaier JF, Molteni F, Abdulla S, Montgomery SM, Kaneko A, Björkman A: **Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar.** *PLoS Med* 2007, **4**:e309.
 45. MSF: *Améliorer l'accès aux traitements efficaces contre le paludisme au Mali: expérience positive de réduction de la barrière financière pour les patients dans le cercle de Kangaba.* http://www.msf.org/jp/info/pressreport/pdf/Mali_malaria2008.pdf.
 46. Ord R, Alexander N, Dunyo S, Hallett R, Jawara M, Targett G, Drakeley CJ, Sutherland CJ: **Seasonal carriage of pfcr1 and pfmdr1 alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites.** *J Infect Dis* 2007, **196**:1613–1619.
 47. Ursing J, Kofoed PE, Rodrigues A, Rombo L: **No seasonal accumulation of resistant *P. falciparum* when high-dose chloroquine is used.** *PLoS One* 2009, **4**:e6866.
 48. Boni MF, Smith DL, Laxminarayan R: **Benefits of using multiple first-line therapies against malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:14216–14221.
 49. World Health Organization: *Country Antimalarial Drug Policies: by Region.* www.who.int/malaria/am_drug_policies_by_region_afro/.
 50. White NJ: **Preventing antimalarial drug resistance through combinations.** *Drug Resist Updat* 1998, **1**:3–9.
 51. Nosten F, van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, McGready R, ter Kuile F, Looareesuwan S, White NJ: **Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study.** *Lancet* 2000, **356**:297–302.
 52. Oduola AM, Milhous WK, Salako LA, Walker O, Desjardins RE: **Reduced in-vitro susceptibility to mefloquine in West African isolates of *Plasmodium falciparum*.** *Lancet* 1987, **2**:1304–1305.
 53. Talisuna AO, Langi P, Bakyaita N, Egwang T, Mutabingwa TK, Watkins W, Van Marck E, D'Alessandro U: **Intensity of malaria transmission, antimalarial-drug use and resistance in Uganda: what is the relationship between these three factors?** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**:310–317.
 54. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ: **Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria.** *N Engl J Med* 2009, **361**:455–467.
 55. Phyto AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NP, White NJ, Anderson TJ, Nosten F: **Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study.** *Lancet* 2012, **379**:1960–1966.
 56. Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, Sokhna C, Pradines B, Cojean S, Guillotte M, Bischoff E, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Ariey F, Patarapotikul J, Le Bras J, Trape JF, Rogier C, Mercereau-Puijalon O: **Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use.** *PLoS One* 2007, **2**:e139.
 57. Hastings IM, Watkins WM: **Tolerance is the key to understanding antimalarial drug resistance.** *Trends Parasitol* 2006, **22**:71–77.

doi:10.1186/1475-2875-12-35

Cite this article as: Gharbi et al.: Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of *Plasmodium falciparum* in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000–2011. *Malaria Journal* 2013 **12**:35.

7 - DISCUSSION

L'émergence de la résistance aux traitements fait partie de la dynamique de la majorité des pathologies infectieuses. Plus particulièrement, la résistance aux antipaludiques soulève de nombreuses craintes du fait que nous soyons, à l'heure actuelle, en présence des dernières molécules efficaces disponibles. Alors que la notion d'éradication du paludisme apparaissait lors de la 8^{ème} Assemblée Mondiale de la Santé à Mexico en 1955, l'émergence de résistance aux traitements efficaces (chloroquine, SP, etc.), s'ajoutant aux coûts élevés et aux contraintes logistiques de la lutte anti-vectorielle, du dépistage des cas, des traitements et des campagnes de prévention, ont réduit ces prétentions au profit d'une stratégie de contrôle, adoptée fin des années 1970s [214,215,216].

Cette notion de contrôle fait appel à une surveillance plus importante et plus efficace de l'émergence ou du suivi des résistances [169]. Face à une information insuffisante et parfois peu standardisée provenant des études de terrain, une approche innovante et complémentaire s'est avérée nécessaire. Or, jusqu'ici, les données relatives aux voyages ont été peu, voire non exploitées par les systèmes de veille sanitaire de l'émergence de résistance aux antipaludiques.

Le travail que nous présentons ici, évalue cette approche innovante de l'utilisation des données de surveillance des cas importés comme système sentinelle de l'émergence et de l'évolution des résistances. Cette démonstration a été publiée pour de nombreuses autres pathologies infectieuses telles que les maladies entériques dont la période d'incubation est relativement courte [217,218,219,220]. La relation entre le voyage et la déclaration d'une pathologie est plus incertaine dans le cas des maladies à longue durée d'incubation (supérieure à un mois). En dépit du fait que les voyageurs ont permis dans le passé la détection de l'émergence de la résistance à la chloroquine dans de nombreux pays africains, cette source d'informations riches et pertinentes est sous-exploitée en pratique (**Tableau 9**).

Pays	Date du cas	Date de publication	Pays de détection	Référence
Kenya	1978	1979	Danemark	[121]
Afrique de l'Est (Kenya-Tanzanie)	1975	1979	Etats-Unis	[221]
République Démocratique du Congo (Ex-Zaire)	1982	1983	Etats-Unis	[222]
Burundi	1983	1984	France	[223]
République of the Congo	1984	1985	France	[224]
Cameroun	1984	1985	France	[124]
Angola	1984	1984	Danemark	[225]
Gabon	1985	1986	Etats-Unis	[226]
Bénin	1986	1986	France	[227]
Sénégal	1986	1987	Suède	[125]
Côte d'Ivoire	1987	1988	France	[228]
Mali	1987	1988	France	[229]

Tableau 9: Premiers cas publiés de résistance à la chloroquine en Afrique détectés à travers la surveillance des voyageurs

L'utilisation de la surveillance des voyageurs infectés par *P. falciparum* après un séjour en zone endémique dans le suivi des résistances aux antipaludiques, présente de nombreux avantages qu'il faut souligner. L'absence ou la faible immunité acquise vis-à-vis du paludisme, ainsi que le faible risque de réinfection permettent de mieux identifier un échec thérapeutique lié à une résistance. Les méthodes sont standardisées, facilitant l'homogénéité et la comparabilité des données. La collecte des données en continu permet la mise en place d'études longitudinales pour le suivi des tendances de la résistance. Le large spectre des zones visitées par les voyageurs permet de collecter de l'information dans des zones impaludées et pour des périodes de temps, où l'information n'est pas autrement disponible. Des outils biologiques performants, sophistiqués et standardisés sont disponibles au sein des systèmes de surveillance des voyageurs. Enfin, la présence de données transversales, telles que les données épidémiologiques, cliniques, pharmacologiques, moléculaires et de sensibilité *in vitro*, permet une évaluation complète de l'efficacité thérapeutique.

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'utilité de la surveillance des voyageurs à partir de données nationales du CNR Palu France. Néanmoins, en raison de certaines limites

qui persistent dans la méthodologie, ce système de surveillance ne peut être que complémentaire des études de terrain, sans vocation à les remplacer.

En effet, la population sentinelle utilisée, les voyageurs, est peu représentative des populations autochtones sur le terrain. Elle diffère par de nombreux facteurs tels que le statut immunitaire vis-à-vis de *P. falciparum*, l'âge, la parasitémie initiale, le risque de réinfection, la présence de concentrations sub-thérapeutiques par l'automédication ou les contrefaçons, plus fréquente en zone endémique, etc. La surveillance des voyageurs ne permet pas l'obtention de données de prévalence en raison de l'impossibilité de connaître la population cible (dénominateur) mais reste un bon indicateur de l'émergence ou des tendances de la résistance en zone impaludée.

Certaines limitations ont également été identifiées concernant l'information collectée par le CNR Palu France. Les données renseignées sont fortement liées aux zones visitées par les voyageurs et dépendent en partie de facteurs politiques, économiques ou environnementaux. L'identification du lieu probable de la contamination est difficile à établir. Les données de voyage à l'échelle plus fine que le pays ne sont pas rapportées et seraient difficilement exploitables. Un système de surveillance, s'il se veut pérenne et informatif, ne peut pas être totalement exhaustif et un choix des variables à renseigner doit s'opérer. L'histoire du patient ne s'appuie que sur son interrogatoire ou sur celui de l'accompagnant pour un enfant. Les données recueillies sont donc tributaires des cliniciens et des biologistes, dont la motivation peut être diminuée par rapport à une étude d'efficacité thérapeutique.

Le délai de transport des échantillons ainsi que la présence de parasitémies faibles retrouvées chez les cas importés font qu'un grand nombre d'isolats ne se cultivent pas. Un biais de sélection est à craindre car les souches résistantes par leur faible potentiel reproducteur ou « fitness », ont un plus grand risque de ne pas pousser lors de la mise en culture.

Malgré les limites identifiées, nous avons pu montrer grâce à notre article 1 que les tendances de la résistance observées chez les cas importés ne diffèrent pas significativement des tendances observées sur le terrain. Les données des voyageurs sont un bon reflet des données de terrain.

Le partage de données standardisées entre plusieurs pays non endémiques peut néanmoins s'avérer nécessaire pour augmenter la masse critique d'informations et la pertinence d'un système de surveillance de la résistance utilisant les voyageurs comme population sentinelle.

La mise en place d'un réseau international des cas importés de paludisme permettrait de mieux couvrir au niveau spatial et temporel la résistance aux antipaludiques. Les données recueillies et analysées participeraient à la confirmation de l'émergence de la résistance aux nouveaux traitements et ainsi contenir leur diffusion en guidant les politiques de santé. L'article 2 nous a confirmé l'utilité du partage de données des voyageurs diagnostiqués en France et au Canada, en favorisant la détection de l'émergence de la résistance à la chloroquine en Haïti.

7.1 Réflexions pour l'amélioration de la surveillance de la résistance à l'échelle internationale

Nous avons vu que la détection et le suivi des résistances aux antipaludiques nécessitent un système de surveillance incluant des mécanismes standardisés, interactifs, réactifs à large échelle et s'appuyant sur des outils de laboratoire et d'investigation sophistiqués. Or, la prise en charge des voyageurs présentant un accès palustre à leur retour de zones impaludées est souvent complète, quasi systématique et utilise des moyens élaborés.

Dans ce contexte, un réseau international de surveillance de la résistance aux antipaludiques des cas importés pourrait être développé en complément du réseau WWARN, dont l'action se limite principalement aux zones endémiques. Les sites de collecte de données associeraient une surveillance clinique à travers les unités de soins hospitaliers, et une surveillance biologique par l'intermédiaire des laboratoires nationaux de référence du paludisme.

Au cours de ce travail, de nombreuses collaborations ont déjà pu être établies, dont certaines sont en cours de formalisation pour la mise en commun des données de résistance des cas importés. Une réflexion commune pour l'optimisation du partage des données a été initiée.

Dans le but d'obtenir des données standardisées, en temps réel et de qualité, deux méthodes de collecte seraient envisageables, en concertation avec les partenaires des pays non endémiques :

- La première possibilité consisterait en une collecte prospective des données, en passant par une plateforme centralisée de recueil d'informations, commune à tous les partenaires. Un dictionnaire commun de variables collectées serait mis en place (**Annexe 1**). Elle utiliserait un générateur de questionnaires en ligne permettant d'intégrer plusieurs volets selon le type de données collectées. Cette plateforme

commune faciliterait la saisie et le partage organisé des données, qui seraient stockées et sécurisées dans un serveur spécifiquement dédié à la surveillance des résistances des cas importés. Des droits différents seraient attribués par un comité de pilotage à chaque partenaire en fonction du rôle de chacun au sein du système de surveillance (consultation simple, saisie et modification des données, extraction, analyse, etc.). Les cliniciens et les biologistes auraient bien entendu un accès complet aux données de leurs patients. L'anonymat des données serait respecté à l'aide d'un numéro d'identifiant attribué au patient.

- La deuxième possibilité, plus simple à élaborer, consisterait à conserver les systèmes de recueil de l'information, déjà en place dans chacun des centres partenaires. On peut parler d'un système distribué. Les données seraient collectées à l'aide des feuilles de déclaration des cas de paludisme, différentes selon les pays collaborateurs (**Annexe 2** : France ; **Annexe 3** : Royaume-Uni ; **Annexe 4** : Canada). Les jeux de données seraient reformatés et standardisés selon des procédures communes. Des outils déjà développés au sein du réseau WWARN pourraient être utilisés pour automatiser les procédures de nettoyage et d'analyse de données.

Des méta-analyses, des analyses de données agrégées, ainsi que des analyses longitudinales pour le suivi des tendances pourront être réalisées, à condition que les définitions des variables collectées soient identiques entre les différents centres.

Pour répondre à l'objectif de la mise en place d'un système sentinelle de l'émergence de la résistance, le premier aspect serait plus adapté. Il éviterait tout délai pouvant exister entre le recueil de l'information au sein de chaque centre ; le traitement et l'analyse des données ; et la diffusion des résultats. Ainsi, une réponse adaptée et efficace des décideurs de santé publique serait possible.

Il existe néanmoins de nombreuses limites à la mise en place d'un tel système de surveillance, en particulier dans la standardisation des méthodes, la mutualisation des données, des compétences, des outils et des systèmes existants ou dans la recherche de fonds. A l'échelle nationale, les systèmes de surveillance ne sont pas toujours homogènes entre eux et les définitions de cas peuvent différer d'un pays à l'autre. Malgré les efforts de standardisation au niveau européen, la qualité et la quantité des données collectées sont souvent hétérogènes

avec une sous-déclaration des cas dans la majorité des pays [230]. L'ensemble de ces limites constituent des défis auxquels les différents pays non endémiques seraient confrontés.

Ce projet répond à une demande des décideurs et des tutelles qui proposent et conseillent des stratégies thérapeutiques au niveau national à l'aide de données mondiales et actualisées en temps réel. Le besoin d'échange d'informations, de transparence et de communication s'est accentué ces dernières années, particulièrement à l'échelle européenne, avec la mise en place de l'ECDC.

Les coûts que représenteraient la mise en place d'un système de surveillance du paludisme d'importation à l'échelle internationale sont élevés. Pourtant, l'investissement des pays industrialisés dans un échange complexe d'informations s'avère indispensable dans un monde en mouvement, où les risques de transmission et de diffusion de la résistance sont augmentés.

Des efforts supplémentaires ont besoin d'être mobilisés pour prédire sur du long-terme et détecter précocement, voire en temps réel, l'émergence et la diffusion des résistances. Ce modèle de surveillance reposerait sur cinq composantes interconnectées : la prédiction ; les systèmes d'alerte précoce et de détection simplifiés et de couverture large ; les investigations cliniques ciblées et intensive dans les zones particulièrement sensibles ; la surveillance de routine sur des sites représentatifs et enfin, une approche rigoureuse et continue pour contenir la résistance. La détection de la résistance de l'artémisinine va nécessiter de nouvelles approches, de nouvelles techniques, de l'innovation et une meilleure collaboration à l'échelle globale, régionale et nationale entre plusieurs partenaires, académiques, industriels, instituts de recherche, ou ministères de la santé [179].

La mise en place d'une surveillance adaptée de la résistance aux antipaludiques est le premier niveau pour un contrôle efficace de la diffusion des résistances. Il permettra aux pays non endémiques de mieux traiter leurs patients avec des thérapeutiques efficaces et appropriées et facilitera les pays endémiques à détecter des événements rares qu'ils ne pourraient voir autrement. Les autorités sanitaires, grâce à une alerte précoce, pourront rapidement élaborer et adopter des mesures de santé publique pour un meilleur contrôle du paludisme dans le monde.

7.2 Quelles stratégies globales de prévention pour contrôler la diffusion et l'émergence de la résistance en zone endémique ?

7.2.1 Plan mondial de confinement de la résistance aux dérivés de l'artémisinine (GPARC)

Nous avons vu que la résistance aux dérivés de l'artémisinine a émergé dans la région de Pailin, à l'Ouest du Cambodge, et jusqu'ici, est restée contenue dans la sous-région du Grand Mékong, comprenant le Cambodge, la Thaïlande, le Yunnan (province chinoise), le Laos, le Myanmar et le Vietnam [30]. Or, il y a plus de cinquante ans, les résistances à la chloroquine, puis à la SP, sont apparues dans cette même zone avant de diffuser vers l'Afrique [66,231]. La diffusion des résistances aux dérivés de l'artémisinine à partir du foyer bordant la frontière Thaïlande-Cambodge, causerait l'échec de la plupart des stratégies de contrôle et d'éradication du paludisme.

Dans le but de prévenir la diffusion des résistances à l'artémisinine, le GPARC a été développé par le Programme Mondial du Paludisme de l'OMS après une consultation de plus de 100 experts. L'OMS fait part dans un rapport des activités essentielles pour le bon contrôle de la diffusion des résistances aux dérivés de l'artémisinine [169]. Dans les zones où il existe des preuves tangibles de résistance, l'application des recommandations suivantes est apparue une priorité:

- Arrêter la transmission des parasites résistants en augmentant les mesures de prévention, la détection et le traitement des cas.
- Augmenter la surveillance de la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Les sites doivent être évalués au moins tous les deux ans avec une priorité à l'acquisition de données de qualité.
- Améliorer l'accès au diagnostic et l'utilisation rationnelle des CTAs en assurant leur accessibilité et leur qualité. Les campagnes de communication, de promotion et d'éducation à la santé qui ciblent le diagnostic et les traitements sont essentiels.
- Investir dans la recherche liée aux dérivés de l'artémisinine, en particulier la recherche biologique (comme l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires), la recherche et le développement (comme le développement de nouvelles combinaisons),

DISCUSSION

la recherche appliquée et de terrain (comme les études pilotes pour réduire la transmission avec un diagnostic et un traitement de masse), la recherche opérationnelle (comme les programmes pour les populations migrantes), la modélisation mathématique (comme l'impact des résistances sur la transmission du paludisme).

- Motiver les actions et mobiliser les ressources. Le succès de la mise en place de ces actions nécessite des fonds additionnels et une coopération entre tous les acteurs impliqués dans la lutte contre le paludisme.

L'ensemble de ces actions sont des piliers indispensables au bon contrôle de la diffusion de la résistance à l'échelle internationale. Dans le cadre du GPARC, le contrôle et la surveillance active ont été renforcées des deux côtés de la frontière Thaïlande-Cambodge [232] (**Figure 22**).



Figure 22: Plan de confinement de la résistance au niveau de la frontière Thaïlande – Cambodge (Source: FAO GAUL – Release January 2007; Department of Geography; Royal Government of Cambodia; Global Containment Project, WHO)

Une des propositions pour endiguer l'expansion des résistances au reste de la zone tropicale serait d'éliminer, au moins transitoirement, le paludisme à *P. falciparum* au niveau de ce foyer [233,234].

Pourtant, de nombreux facteurs spécifiques à la sous-région du Grand Mékong entravent les missions d'endiguement de la résistance par les organisations nationales ou internationales [235].

Dans un premier temps, la pression médicamenteuse unique et massive persiste dans la région. L'artésunate et les dérivés d'artémisinine non réglementés étaient disponibles en monothérapie depuis le milieu des années 70s. Malgré la promotion des CTAs comme première ligne de traitement depuis 2001, de nombreux patients continuent à se procurer ces molécules via le secteur privé (78% des patients en 2008) [236]. L'absence d'une combinaison artésunate+méfloquine à dose fixe au sein d'un même comprimé, continue à favoriser l'utilisation des monothérapies. La circulation de nombreuses CTAs de pauvre qualité, ne respectant pas les standards de fabrication, contribue à sélectionner les souches résistantes. Une étude récente montre également que le dosage fixe de la pipéraquline, présent au sein de la CTA : dihydroartémisinine+pipéraquline et recommandé chez les enfants en fonction de l'âge plutôt que du poids réel, ne serait pas adapté aux patients se situant aux extrêmes d'une fourchette. Les doses plus ou moins élevées reçues par les patients en marge d'une classe affecteraient de façon significative l'efficacité du traitement (étude WWARN en cours de publication).

Dans un deuxième temps, les caractéristiques socio-environnementales particulières à la sous-région du Grand Mékong participent à en faire la zone 'épicerie de la résistance'. La province de Pailin est particulièrement sensible. La présence d'importantes richesses minières dans son sol favorise les mouvements de populations de migrants, faiblement ou non immunisées contre *P. falciparum*. Ces populations susceptibles, dont le nombre est difficile à estimer, pourraient favoriser la diffusion des résistances à l'artémisinine.

Puis, la faible transmission du paludisme dans cette région favorise la présence de populations faiblement immunisées, donc plus à risque de déclarer un paludisme symptomatique et de prendre un traitement antipaludique de façon intermittente. Les souches résistantes sont sélectionnées et s'établissent dans la population de parasites plus aisément.

Les vecteurs exophiles dans cette région sont plus enclin à piquer en début de soirée avant le coucher, contrairement à l'Afrique, rendant peu efficace l'utilisation de moustiquaires

imprégnées d'insecticides à effet durable et de pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent.

Les souches locales de *P. falciparum* pourraient posséder des caractéristiques génétiques telles que le défaut de réparation des mésappariements d'ADN, favorisant le développement rapide des résistances aux antipaludiques [237,238].

Néanmoins, certaines questions restent en suspens concernant les mécanismes moléculaires associés à la résistance aux dérivés de l'artémisinine ou la capacité des souches résistantes à diffuser au-delà de l'Asie du Sud-Est et à s'implanter au sein d'autres populations humaines. Il est donc crucial d'identifier l'extension des résistances le plus tôt possible afin de mettre en place des mesures appropriées [239]. Le plus grand défi se trouve en Afrique, où le poids du paludisme et la transmission sont encore très élevés et où la baisse d'efficacité des CTAs serait lourde de conséquence en terme de santé publique.

7.2.2 Agir sur les stratégies thérapeutiques nationales pour retarder l'émergence de résistance

7.2.2.1 Changement dynamique des stratégies thérapeutiques

Dans le passé, il s'est souvent avéré qu'en dépit de la confirmation d'un fort taux d'échecs cliniques ou de résistance à un antipaludique, celui-ci continuait à être proposé très largement comme première ligne de traitement. Ce fut le cas pour la chloroquine, dont les conséquences ont été un fort taux d'accroissement de la morbidité et de la mortalité [173,209]. Des seuils arbitraires parasitologiques ou économiques étaient utilisés comme indicateur de changement d'une première ligne de traitement. Néanmoins, les décideurs nationaux restaient libres de modifier les stratégies thérapeutiques quand ils le souhaitaient.

Même en cas de perception de la perte d'efficacité d'un médicament, le changement de politique implique une multiplicité de facteurs et nécessite un long processus de mise en oeuvre (**Tableau 10**) [240,241].

DISCUSSION

Politiques	Juridiques	Socioculturels	Economiques	Biomédicaux/ Technologiques	Environnementaux / épidémiologiques	Systèmes de santé
Approvisionnement	Questions réglementaires	Accès à la prévention, diagnostic et traitement*	Coût des molécules de remplacement	Efficacité thérapeutique	Modalités locales de transmission	Système de formations du personnel de santé
Accessibilité des frontières nationales	Approvisionnement	Acceptabilité stratégies préventive et curative	Coût de retrait du précédent traitement	Effectivité opérationnelle	Pression médicamenteuse	Accès à la prévention, diagnostic et traitement
Stabilité politique et conjoncture	Restrictions commerciales légales	Pratiques thérapeutiques: prestataires de santé et consommateurs	Disponibilité des médicaments	Statut réglementaire du traitement de 1ere intention précédent	Contexte épidémiologique local	Disponibilité des médicaments
Système informel de pouvoir: réseaux	Accessibilité aux frontières	Comportement de recours aux soins	Approvisionnement	Traitements disponibles dans le secteur privé?	Présence de populations déplacées	Implication du secteur privé
Système officiel de pouvoir	Degré de réforme du secteur de santé et décentralisation	Système informel de pouvoir : réseaux sociaux	Influences du secteur privé	Sécurité du médicament		Système d'organisation officiel du MS
Degré de réforme du secteur de la santé et décentralisation	Impact de groupes d'intérêt particuliers	Disponibilité des médicaments*	Modes d'utilisation des médicaments	Changements formulaires nationaux et des listes de médicaments essentiels		Taux d'attrition du personnel de santé
Durée nécessaire pour le changement de politique	Catégorie légale de médicament	Manque de confiance dans le secteur public de santé	Sélection du traitement de remplacement	Sélection du traitement de remplacement		Financement alloué au MS et au PNLP
Priorités divergentes (nationales/locales)	Programmes d'ajustement structurel		Priorités de santé divergentes : VIH, maladies émergentes non transmissibles	Distribution du médicament		Suivi de la réglementation
Impact de groupes d'intérêt particuliers			Intérêts de l'industrie pharmaceutique	Capacité à produire médicament de qualité localement pour utilisation et exportation		Système de distribution des médicaments
Statut du PNLP au sein du MS			Programmes d'ajustement structurel	Besoins et capacités en moyens de diagnostic		Degré de décentralisation
Statut du MS vis-à-vis des autres ministères				Contrôle qualité des médicaments		Faible moralité des agents de santé
Intérêts de l'industrie pharmaceutique						Capacités de gestion des médicaments déficientes

Tableau 10: Facteurs influençant le développement et la mise en place de politiques de traitement antipaludique rationnelles (adapté de Williams *et al.* 2004) PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ; MS : Ministère de la Santé

A partir de 1999, une échelle de changement dynamique des stratégies thérapeutiques a donc été élaborée pour les régions à forte transmission, sur la base des taux d'échec clinique à J14 [242]. L'OMS préconise actuellement l'introduction de nouvelles combinaisons thérapeutiques plus efficaces, seulement si ce nouveau traitement antipaludique atteint une efficacité supérieure à 95%. Un changement de politique ne s'envisage que si l'efficacité du traitement apparaît inférieure à 90% à J28 [7]. Ainsi, entre 2001 et 2011, 79 pays ont modifié leur politique nationale en faveur des CTAs [14] (**Figure 10**).

7.2.2.2 Remplacement des monothérapies par des combinaisons thérapeutiques.

L'utilisation des monothérapies s'est également avérée un facteur d'émergence des résistances aux antipaludiques. Les monothérapies, moins coûteuses que les bithérapies, restent encore largement utilisées.

Pour diminuer l'émergence de la résistance à ces monothérapies, il a été proposé dans un premier temps une augmentation des doses administrées. Ce protocole a été évalué au cours d'un essai clinique randomisé, réalisé entre 2008 et 2009 dans l'Ouest du Cambodge. L'administration de doses croissantes d'une monothérapie à l'artésunate n'a montré aucune différence significative entre les différents bras testés pour les taux d'échecs cliniques à J28 et à J42 [243].

Le remplacement complet des monothérapies et des médicaments de mauvaise qualité par les associations de qualité est majeur pour retarder la diffusion des résistances [154]. La modélisation de différentes stratégies d'élimination des souches résistantes à l'artémisinine a placé cette intervention comme la plus efficace (temps moyen d'élimination : 3.42 années (IC95, 3,32 – 3,60)) [233]. Pour répondre à cet objectif, la baisse du prix des CTAs est indispensable. L'Institute of Medicine Committee (IOM) recommande la mise en place d'un fond international pour l'achat des CTAs au coût de production, afin de les revendre à un coût inférieur à celui proposé par les laboratoires [244]. Une des initiatives actuellement en place pour faciliter l'accès aux traitements est l'Affordable Medicines Facility – malaria (AMFm). Sous l'égide du Fond Mondial et financé par UNITAID et le 'Department for International Development' (DFID) au Royaume-Uni, cette initiative permet, entre autres, d'obtenir des prix négociés avec les industriels pour les acheteurs de première ligne du secteur public, privé ou les organisations non gouvernementales (ONGs). L'objectif est d'élargir l'accès des patients aux CTAs à des prix concurrençant ceux de la chloroquine ou de la SP et inférieurs à

ceux des monothérapies d'artémisinine. L'évaluation de cette initiative a montré que le nombre de traitement de CTAs délivré au secteur public et privé a globalement augmenté de 11 à 76 millions entre 2005 et 2006 pour atteindre 278 millions en 2011 [14].

Néanmoins, ce programme ne pourra être totalement efficient que s'il associe la distribution de traitements à bas prix à la distribution de tests pour le diagnostic parasitologique du paludisme. En effet, de nombreux commerçants n'incitent pas à l'utilisation de tests de diagnostic rapide qui pourrait se solder par un échec de la vente de CTAs [245]. L'ONG Oxfam a également dénoncé un gaspillage des médicaments financés par l'AMFm et distribués à des patients n'en ayant pas toujours le besoin, en particulier dans le cadre d'une phase pilote réalisée dans sept pays d'Afrique où plus de 150 millions de doses avaient été commandées, soit plus de cinq fois le nombre estimé de cas de paludisme dans l'ensemble de ces pays [245].

7.2.2.3 Administration simultanée de trois molécules ou plus

Toujours dans le but de diminuer la diffusion de la résistance, il a été proposé d'administrer simultanément trois molécules ou plus, comme il se fait couramment pour d'autres pathologies telles que la tuberculose ou le VIH [246,247]. L'association d'un dérivé de l'artémisinine et de deux molécules partenaires n'a pas encore été totalement explorée, en particulier une CTA associée à une molécule gamétocyde telle que la primaquine. Le risque important d'interactions ainsi que le délai augmenté pour obtenir les autorisations auprès des instances régulatrices sont autant de facteurs qui ont retardé l'adoption d'une telle approche.

7.2.2.4 Administration de traitement de masse

Une autre approche proposée pour éliminer les souches résistantes de paludisme dans une zone limitée reste l'administration de masse d'un traitement complet et efficace à l'ensemble de la population, en dépit du statut de la maladie. Le défi logistique est important et nécessite que l'ensemble de la population accepte de participer, en adhérant au traitement complet. Le traitement doit agir sur la transmission gamétocytaire, en absence d'effets indésirables. Malgré des tentatives dans le passé d'une telle pratique, le risque d'aggraver la résistance est élevé, plaçant l'élimination seulement comme but ultime pour l'OMS [239].

7.2.2.5 Dépistage de masse et traitement

Une approche plus consensuelle est le dépistage de masse puis le traitement ciblé de la population infectée par *P. falciparum*. Cependant, la crainte de ne pas être capable de détecter les faibles parasitémies ou de ne pas atteindre une couverture suffisante pour agir sur la transmission persiste. Cette approche, pas encore expérimentée en pratique, a été modélisée pour évaluer son impact sur la diffusion de la résistance. La modélisation prédit un nombre réduit d'infections mais une proportion augmentée de souches résistantes. De plus, elle prédit que le dernier parasite survivant sera le plus résistant d'entre tous. Il semble donc nécessaire de diminuer autant que possible les parasites *P. falciparum* et de traiter les derniers résistants à l'artémisinine avec un traitement alternatif pour une élimination complète du paludisme [233].

7.2.2.6 Mise en place de premières lignes thérapeutiques multiples dans un pays.

Certains travaux ont mis en évidence l'importance d'une utilisation prudente et limitée des CTAs afin de diminuer la sélection des souches résistantes; l'hypothèse étant que le taux de résistance à une molécule est proportionnel à la pression médicamenteuse de cette molécule dans une population. Nos articles 3 et 4 confirment cette hypothèse. Cependant, au niveau pragmatique, peu de stratégies sont acceptables permettant de réduire la pression médicamenteuse sans affecter la prise en charge thérapeutique efficace des patients. L'utilisation de premières lignes de traitement multiples pourrait être une des solutions. Cette stratégie consiste à traiter une population globale par deux CTAs différentes, réduisant de moitié la pression médicamenteuse. La segmentation de la population peut se faire par classe d'âge ou selon le lieu d'administration des soins (hôpital ou soins à domicile), etc. [248,249]. L'alternance des premières lignes de traitement au cours du temps peut être également une solution à envisager, pour participer à la réduction de la pression médicamenteuse dans une zone endémique. Pourtant, les difficultés logistiques qui découleraient de cette stratégie ne doivent pas être sous-estimées. Certains pays tels que le Cambodge ont déjà, via le secteur privé, un nombre important d'antipaludiques circulant. Il y a donc plus de bénéfice ici à encourager la disponibilité de multiples molécules effectives dans le secteur privé plutôt que de promouvoir activement les premières lignes thérapeutiques multiples.

L'ensemble de ces stratégies ne pourront se mettre en place que si un effort important est réalisé parallèlement sur la qualité des systèmes de santé. Pour la mise en place de stratégies pérennes et efficaces, les moyens doivent être renforcés au niveau des infrastructures et des capacités logistiques et humaines permettant de supporter de tels changements.

7.2.3 Quelles perspectives dans le futur?

Dans le futur, le développement de vaccins efficaces pourrait être la solution. Nombreux candidats sont en cours de développement avec comme cible principale : la réduction de la mortalité infantile. Si un vaccin s'avérait efficace, la difficulté peut consister à produire ce vaccin en quantité suffisante et à le commercialiser à un prix abordable pour une utilisation de masse dans les pays en développement. En raison des difficultés à prévenir la diffusion des souches résistantes, de nombreux espoirs reposent sur la vaccination qui pourrait représenter une solution complète et permanente contre la transmission du paludisme.

Des efforts dans le développement de nouveaux traitements doivent être réalisés. Mais une question se pose à savoir qui va permettre cette recherche peu lucrative. En effet, la majorité des traitements ayant eu un impact majeur sur la dynamique du paludisme a été développé dans un contexte de guerre. Des motivations plus nobles sont à espérer dans le futur pour le développement des nouveaux antipaludiques. Jusqu'ici, les industries pharmaceutiques n'ont montré que peu d'intérêt pour le paludisme et ont focalisé leurs efforts sur des pathologies plus rentables, ayant une prévalence élevée dans les pays industrialisés. Une initiative associant les secteurs public et privé, telle que Medicines for Malaria Venture (MMV), permet de proposer un modèle efficace permettant le financement du développement de nouveaux médicaments. L'ensemble des nouvelles molécules en cours de développement est résumé dans l'annexe 5. La plupart de ces molécules proviennent de l'initiative MMV. En outre, les approches modernes, telles que le criblage à haut débit d'un grand nombre de composés, peuvent également fournir de nouvelles pistes pour les médicaments antipaludiques.

8 - CONCLUSION

CONCLUSION

L'ensemble de ce travail a montré l'importance d'une surveillance de qualité des résistances aux antipaludiques afin de savoir si les nouvelles combinaisons médicamenteuses restent actives. Une stratégie thérapeutique dynamique, au niveau national et international, est un facteur déterminant pour un contrôle efficace du paludisme.

Les progrès techniques de ces dernières années ont permis l'accès à des données d'efficacité précises et de qualité pour suivre l'évolution des résistances. Pour autant, l'implantation de ces nouvelles méthodes de surveillance en routine, telles que des techniques sophistiquées (tests moléculaires et tests *in vitro*) associées à un allongement de la durée du suivi des patients, augmente les coûts de la surveillance et rend complexe son intégration dans la lutte contre le paludisme.

Dans les zones endémiques, la surveillance de l'efficacité des CTAs est majeure en raison de l'émergence des résistances à ces dernières molécules efficaces contre le paludisme. Néanmoins, cette surveillance nécessite des moyens logistiques et financiers encore difficiles à mobiliser dans certaines régions en développement. Malgré le soutien d'organismes internationaux tels que le Fond Mondial ou la Banque Mondiale et les diverses initiatives de lutte contre le paludisme, de nombreux pays endémiques sont confrontés à un déficit de financement pour mettre en place un système de surveillance de l'efficacité des antipaludiques, pérenne et spécifique. Cette approche peut donc être complétée et améliorée par une source d'information majeure et déjà en place, provenant de la surveillance des voyageurs, qui faciliterait les décideurs à répondre aux missions d'endiguement de la résistance.

La mise en place d'un système de surveillance international utilisant les cas importés serait un soutien important avec une action complémentaire aux systèmes déjà en place dans les zones impaludées. Il permettrait la détection de l'émergence et le suivi des tendances des résistances aux antipaludiques en zone endémique, où l'information est peu ou pas accessible. Il aiderait par sa maniabilité, sa fiabilité et sa continuité dans le temps à orienter les stratégies thérapeutiques et à adapter les politiques de santé publique en temps réel.

Les efforts de surveillance dans les pays non endémiques et endémiques peuvent être mutuellement bénéfiques : les médecins des pays non endémiques basent leur décision de chimioprophylaxie et de traitement curatif sur les tendances observées dans les pays endémiques, alors qu'un échec thérapeutique ou une résistance confirmée chez un cas importé peut servir d'alerte précoce de l'émergence d'une résistance en pays endémique.

CONCLUSION

L'absence d'immunité acquise contre le paludisme, l'absence de réinfection et la faible pression médicamenteuse chez les voyageurs, rendent la surveillance de cette population peu représentative de la situation sur le terrain. Pourtant, ces limites sont également des points forts dans la surveillance des résistances car elles permettent aux cas importés d'être de très bons éléments pour un contrôle non biaisé de l'efficacité thérapeutique.

Des développements récents dans les méthodes de diagnostic et d'identification de la résistance, ont permis une caractérisation étendue du *Plasmodium*, et ont généré de nouvelles stratégies pour le diagnostic, la surveillance et la prise en charge. Les enjeux actuels sont donc d'améliorer la surveillance des résistances mais également d'inclure ces nouvelles technologies dans la réalité du paludisme en les rendant appropriées, abordables et faciles à intégrer dans les structures de santé des pays en développement.

L'ensemble de ces actions sont essentiels pour le contrôle de la diffusion de la résistance. Néanmoins, elles nécessitent des fonds d'investissement importants qui sont réduits chaque année en raison du contexte économique. La mobilisation pour le paludisme est en forte diminution en raison de la réduction de la prévalence de cette pathologie dans le monde. Pourtant, le nombre limité de traitement efficace contre cette pathologie, les changements climatiques et environnementaux, ainsi que l'augmentation chaque année des mouvements de population font craindre une résurgence du paludisme en zone endémique, voire non endémique.

9 - REFERENCES

REFERENCES

1. White NJ (2008) *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 46: 172-173.
2. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H (2004) Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis* 10: 2211-2213.
3. Pasvol G (2010) Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet* 42: 284-285.
4. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, et al. (2008) Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5: e128.
5. Nurleila S, Syafruddin D, Elyazar IR, Baird JK Serious and fatal illness associated with *falciparum* and *vivax* malaria among patients admitted to hospital at West Sumba in eastern Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 87: 41-49.
6. WHO (2000) Management of severe malaria: a practical handbook. Geneva: World Health Organization. pp. 84.
7. WHO (2010) Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization. pp. 211.
8. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C (1999) Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 5: 340-343.
9. Doolan DL, Dobano C, Baird JK (2009) Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 22: 13-36, Table of Contents.
10. Mouchet J, Manguin S, Sircoulon J, Laventure S, Faye O, et al. (1998) Evolution of malaria in Africa for the past 40 years: impact of climatic and human factors. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 121-130.
11. Schofield L, Mueller I (2006) Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med* 6: 205-221.
12. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, et al. (2009) A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Med* 6: e1000048.
13. Patz JA, Olson SH (2006) Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5635-5636.
14. WHO (2012) World Malaria Report 2012. Geneva: World Health Organization. 260 p.
15. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, et al. (2010) Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med* 7: e1000290.
16. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2095-2128.
17. D'Alessandro U (1998) Antimalarial drug resistance: surveillance and molecular methods for national malaria control programmes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 627-630.
18. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR (2002) Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2: 209-218.
19. Le Bras J, Musset L, Clain J (2006) [Antimalarial drug resistance]. *Med Mal Infect* 36: 401-405.
20. Iyer JK, Milhous WK, Cortese JF, Kublin JG, Plowe CV (2001) *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet* 358: 1066-1067.
21. Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, et al. (1998) In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother* 42: 333-339.
22. Winstanley P (2001) Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect Dis* 1: 242-250.
23. Wernsdorfer WH, Payne D (1991) The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 50: 95-121.

REFERENCES

24. White N (1999) Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 739-749.
25. Molyneux DH, Floyd K, Barnish G, Fevre EM (1999) Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitol Today* 15: 238-240.
26. Pongtavornpinyo W, Yeung S, Hastings IM, Dondorp AM, Day NP, et al. (2008) Spread of anti-malarial drug resistance: mathematical model with implications for ACT drug policies. *Malar J* 7: 229.
27. Wernsdorfer WH (1994) Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop* 56: 143-156.
28. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, et al. (2008) Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359: 2619-2620.
29. Wongsrichanalai C, Meshnick SR (2008) Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 14: 716-719.
30. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, et al. (2009) Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361: 455-467.
31. WHO (2009) Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization.
32. Basco LK (2007) Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization. pp. 202.
33. WHO (2008) Methods and techniques for clinical trial trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization, 29-31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands. Geneva: World Health Organization.
34. WHO (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: World Health Organization. 116 p.
35. WHO (1973) Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organization.
36. WHO (1965) Resistance of malaria parasites to drugs. Report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organization.
37. WHO (1996) Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. Geneva: World Health Organization.
38. WHO (2003) Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization.
39. Stepniewska K, Taylor WR, Mayxay M, Price R, Smithuis F, et al. (2004) In vivo assessment of drug efficacy against *Plasmodium falciparum* malaria: duration of follow-up. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4271-4280.
40. Magesa SM, Mdira KY, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, et al. (2001) Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 65: 477-483.
41. Eboumbou Moukoko EC, Bogreau H, Briolant S, Pradines B, Rogier C (2009) [Molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance]. *Med Trop (Mars)* 69: 606-612.
42. Snounou G, Beck HP (1998) The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today* 14: 462-467.
43. Simpson JA, Aarons L, White NJ (2001) How can we do pharmacokinetic studies in the tropics? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 347-351.

REFERENCES

44. Aubouy A, Bakary M, Keundjian A, Mbomat B, Makita JR, et al. (2003) Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 231-237.
45. Barnes KI, Little F, Smith PJ, Evans A, Watkins WM, et al. (2006) Sulfadoxine-pyrimethamine pharmacokinetics in malaria: pediatric dosing implications. *Clin Pharmacol Ther* 80: 582-596.
46. Price RN, Hasugian AR, Ratcliff A, Siswantoro H, Purba HL, et al. (2007) Clinical and pharmacological determinants of the therapeutic response to dihydroartemisinin-piperaquine for drug-resistant malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4090-4097.
47. Baxerres C, Le Hesran JY (2011) Where do pharmaceuticals on the market originate? An analysis of the informal drug supply in Cotonou, Benin. *Soc Sci Med* 73: 1249-1256.
48. Nayyar GM, Breman JG, Newton PN, Herrington J Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 12: 488-496.
49. Newton PN, Green MD, Mildenhall DC, Plancon A, Nettey H, et al. Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health priority. *Malar J* 10: 352.
50. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, et al. (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344: 257-263.
51. Scholar EM (2000) *The antimicrobial drugs*. Oxford: Oxford University Press. pp. 607.
52. Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ (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: 9109-9113.
53. Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3018-3022.
54. Thaithong S, Chan SW, Songsomboon S, Wilairat P, Seesod N, et al. (1992) Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 52: 149-157.
55. Le Bras J, Durand R (2003) The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 147-153.
56. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, et al. (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: 397-405.
57. Triglia T, Cowman AF (1994) Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7149-7153.
58. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, et al. (1997) Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* 89: 161-177.
59. Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, et al. (2000) Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 991-996.
60. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Akinboye DO, Yusuf BO, et al. (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: 183-193.

REFERENCES

61. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, et al. (2002) Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 185: 380-388.
62. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA (2002) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science* 298: 210-213.
63. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, Horrocks P, et al. (2005) A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J* 24: 2294-2305.
64. Valderramos SG, Fidock DA (2006) Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci* 27: 594-601.
65. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M (2007) Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 23: 332-339.
66. Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, et al. (2002) Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418: 320-323.
67. Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Martensson A, Premji Z, et al. (2009) In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfcr*t K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis* 199: 750-757.
68. Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouedraogo JB, et al. (2006) Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 75: 162-165.
69. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Bolaji OM, Sowunmi A, et al. (2006) Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 75: 155-161.
70. Holmgren G, Gil JP, Ferreira PM, Veiga MI, Obonyo CO, et al. (2006) Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfcr*t 76T and *pfmdr*1 86Y. *Infect Genet Evol* 6: 309-314.
71. Rohrbach P, Sanchez CP, Hayton K, Friedrich O, Patel J, et al. (2006) Genetic linkage of *pfmdr*1 with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 25: 3000-3011.
72. Sanchez CP, Rotmann A, Stein WD, Lanzer M (2008) Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 70: 786-798.
73. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, et al. (2000) The tyrosine-86 allele of the *pfmdr*1 gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* 108: 13-23.
74. Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA (2005) *pfmdr*1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 57: 913-926.
75. Anderson TJ, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, et al. (2005) Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcr*t) and multidrug resistance gene (*pfmdr*) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2180-2188.
76. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, et al. (1993) Amplification of *pfmdr* 1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 57: 151-160.

REFERENCES

77. Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, et al. (1999) The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2943-2949.
78. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, et al. (2004) Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364: 438-447.
79. Price RN, Uhlemann AC, van Vugt M, Brockman A, Hutagalung R, et al. (2006) Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 42: 1570-1577.
80. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, et al. (2009) *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J* 8: 11.
81. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, et al. (2009) Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J* 8: 10.
82. Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, et al. (2004) Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 117: 503-514.
83. Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, et al. (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J Cell Biol* 181: 1107-1116.
84. Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, et al. (2008) *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol* 266: 85-156.
85. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, et al. (2003) Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424: 957-961.
86. Woodrow CJ, Krishna S (2006) Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 63: 1586-1596.
87. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, et al. (2005) Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366: 1960-1963.
88. Pillai DR, Lau R, Khairnar K, Lepore R, Via A, et al. (2012) Artemether resistance in vitro is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J* 11: 131.
89. Woodrow CJ, Gardner KB, Bustamante LY (2012) Questions over high frequency of mutant PfATP6 haplotypes in traveller isolates. *Malar J* 11: 186.
90. Imwong M, Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Mungthin M, et al. (2010) Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2886-2892.
91. Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, et al. (2009) Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem* 284: 7687-7696.
92. Dahlstrom S, Ferreira PE, Veiga MI, Sedighi N, Wiklund L, et al. (2009) *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa. *J Infect Dis* 200: 1456-1464.
93. McFadden DC, Tomavo S, Berry EA, Boothroyd JC (2000) Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol Biochem Parasitol* 108: 1-12.

REFERENCES

94. Syafruddin D, Siregar JE, Marzuki S (1999) Mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Mol Biochem Parasitol* 104: 185-194.
95. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB (1999) Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* 33: 704-711.
96. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, et al. (2000) Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2100-2108.
97. Musset L, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, et al. (2006) Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother* 57: 110-115.
98. Briolant S, Baragatti M, Parola P, Simon F, Tall A, et al. (2009) Multinormal in vitro distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 688-695.
99. Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B (2010) Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with pftetQ sequence polymorphisms and pftetQ and pfmdt copy numbers. *J Infect Dis* 201: 153-159.
100. Djimde AA, Dolo A, Ouattara A, Diakite S, Plowe CV, et al. (2004) Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis* 190: 853-855.
101. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, et al. (2003) Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 187: 1870-1875.
102. Laufer MK, Plowe CV (2004) Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist Updat* 7: 279-288.
103. Djimde AA, Doumbo OK, Traore O, Guindo AB, Kayentao K, et al. (2003) Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69: 558-563.
104. Dzinjalama FK, Macheso A, Kublin JG, Taylor TE, Barnes KI, et al. (2005) Association between the pharmacokinetics and in vivo therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine in Malawian children. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3601-3606.
105. Mbacham W, Njikam N (2007) [Molecular markers for malaria drug resistance: necessary but not sufficient criteria to decide change in treatment policy]. *Med Trop (Mars)* 67: 183-187.
106. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH (2003) Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol* 19: 175-181.
107. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE (1978) Drug sensitivity of *plasmodium falciparum*. An in-vitro microtechnique. *Lancet* 1: 22-23.
108. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 710-718.
109. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, et al. (1993) Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 48: 739-741.
110. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Bresseur PH, Jacquier P (2001) A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-

REFERENCES

- site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 64: 233-241.
111. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C (2002) Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1658-1664.
 112. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, et al. (2004) Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1807-1810.
 113. Laufer MK, Djimde AA, Plowe CV (2007) Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *Am J Trop Med Hyg* 77: 160-169.
 114. Pradines B, Vial H, Olliaro P (2003) [Malaria prophylaxis and treatment: problems, recent developments and perspectives]. *Med Trop (Mars)* 63: 79-98.
 115. Giboda M, Denis MB (1988) Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: in-vivo assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro. *J Trop Med Hyg* 91: 205-211.
 116. Bjorkman A, Phillips-Howard PA (1990) The epidemiology of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 177-180.
 117. Molinier S, Imbert P, Verrot D, Morillon M, Parzy D, et al. (1994) [*Plasmodium falciparum* malaria: type R1 quinine resistance in East Africa]. *Presse Med* 23: 1494.
 118. Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C (1965) Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet* 2: 657-660.
 119. Moore DV, Lanier JE (1961) Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 10: 5-9.
 120. Young MD, Moore DV (1961) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 10: 317-320.
 121. Fogh S, Jepsen S, Effersoe P (1979) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 228-229.
 122. Kihamia CM, Gill HS (1982) Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in semi-immune African Tanzania. *Lancet* 2: 43.
 123. Kyronseppa H, Lumio J, Ukkonen R, Pettersson T (1984) Chloroquine-resistant malaria from Angola. *Lancet* 1: 1244.
 124. Sansonetti PJ, Lebras C, Verdier F, Charmot G, Dupont B, et al. (1985) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Lancet* 1: 1154-1155.
 125. Hellgren U, Ardal OK, Lebbad M, Rombo L (1987) Is chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria emerging in Senegal or The Gambia? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 728.
 126. Triglia T, Cowman AF (1999) The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* 2: 15-19.
 127. Sa JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, et al. (2009) Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18883-18889.
 128. Trenholme CM, Williams RL, Desjardins RE, Frischer H, Carson PE, et al. (1975) Mefloquine (WR 142,490) in the treatment of human malaria. *Science* 190: 792-794.
 129. Boudreau EF, Webster HK, Pavanand K, Thosingha L (1982) Type II mefloquine resistance in Thailand. *Lancet* 2: 1335.
 130. Simpson JA, Watkins ER, Price RN, Aarons L, Kyle DE, et al. (2000) Mefloquine pharmacokinetic-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3414-3424.
 131. Hughes WT, Kennedy W, Shenep JL, Flynn PM, Hetherington SV, et al. (1991) Safety and pharmacokinetics of 566C80, a hydroxynaphthoquinone with anti-Pneumocystis

REFERENCES

- carinii activity: a phase I study in human immunodeficiency virus (HIV)-infected men. *J Infect Dis* 163: 843-848.
132. Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW (1992) The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 30: 827-832.
133. Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB, Farquhar JA, Hall AP, et al. (1995) Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Antimicrob Chemother* 36: 1073-1078.
134. Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, et al. (1996) Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 54: 62-66.
135. Sutherland CJ, Laundry M, Price N, Burke M, Fivelman QL, et al. (2008) Mutations in the *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene are associated with delayed parasite recrudescence in malaria patients treated with atovaquone-proguanil. *Malar J* 7: 240.
136. Patel SN, Kain KC (2005) Atovaquone/proguanil for the prophylaxis and treatment of malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 849-861.
137. Wichmann O, Muehlberger N, Jelinek T, Alifrangis M, Peyerl-Hoffmann G, et al. (2004) Screening for mutations related to atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *J Infect Dis* 190: 1541-1546.
138. Rose GW, Suh KN, Kain KC, Le Saux N, McCarthy AE (2008) Atovaquone-proguanil resistance in imported *falciparum* malaria in a young child. *Pediatr Infect Dis J* 27: 567-569.
139. Gebru T, Hailu A, Kremsner PG, Kun JF, Grobusch MP (2006) Molecular surveillance of mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium falciparum* in Gabon and Ethiopia. *Malar J* 5: 112.
140. WHO (2012) Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of September 2012 meeting. *Malar J* 11: 424.
141. Sinclair D, Meremikwu MM, Garner P (2012) Seasonal Malaria Chemoprevention (formally known as Intermittent Preventive Treatment in children) for preventing malaria morbidity in children aged less than 5 years living in areas of marked seasonal transmission: GRADE tables to assist guideline development and recommendations. Geneva: World Health Organisation.
142. WHO (2000) WHO Expert Committee on Malaria. Twentieth report. Geneva: World Health Organisation.
143. Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L, et al. (1994) The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 51: 515-522.
144. Ter Kuile FO, Steketee RW (2007) Intermittent preventive therapy with sulfadoxine-pyrimethamine during pregnancy: seeking information on optimal dosing frequency. *J Infect Dis* 196: 1574-1576.
145. Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, et al. (1999) Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 353: 632-636.
146. WHO (2004) Malaria and HIV/AIDS interactions and policy implications: conclusions of a technical consultation convened by WHO, 23-25 June 2004., in WHO/HIV/2004.8. Geneva: World Health Organisation.

REFERENCES

147. ter Kuile FO, Parise ME, Verhoeff FH, Udhayakumar V, Newman RD, et al. (2004) The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 71: 41-54.
148. InVS (2011) Health recommendations for travellers, 2011. *BEH* 18-19: 214-221.
149. SPILF (2001) Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum*. 12^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) mercredi 14 avril 1999. *Bull Soc Pathol Exot* 94: 215-219.
150. SPILF (2007) Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum*. Révision 2007 de la conférence de consensus de 1999. Paris: Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française.
151. Zhang JX, Wang JX, Zhang Y, Zuo JP, Wu JM, et al. (2006) [Synthesis and immunosuppressive activity of new artemisinin derivatives containing polyethylene glycol group]. *Yao Xue Xue Bao* 41: 65-70.
152. Enserink M (2007) Combating malaria. *Malaria treatment: ACT two*. *Science* 318: 560-563.
153. WHO (2011) Paludisme : Élaboration de proposition du Fonds mondial (11e Série). Récapitulatif de la politique de l'OMS. Geneva: World Health Organisation.
154. WHO (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000–2010. Geneva: World Health Organization. pp. 121.
155. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P (2009) Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*: CD007483.
156. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N (2005) Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* 366: 717-725.
157. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, et al. (2010) Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 376: 1647-1657.
158. Miller LH, Su X (2011) Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* 146: 855-858.
159. Luxemburger C, Brockman A, Silamut K, Nosten F, van Vugt M, et al. (1998) Two patients with falciparum malaria and poor in vivo responses to artesunate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 668-669.
160. Gogtay NJ, Kadam VS, Karnad DR, Kanbur A, Kamtekar KD, et al. (2000) Probable resistance to parenteral artemether in *Plasmodium falciparum*: case reports from Mumbai (Bombay), India. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 519-520.
161. Sahr F, Willoughby VR, Gbakima AA, Bockarie MJ (2001) Apparent drug failure following artesunate treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Freetown, Sierra Leone: four case reports. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 445-449.
162. Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, et al. (2006) Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. *Trop Med Int Health* 11: 1360-1366.
163. Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, et al. (2006) Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health* 11: 1800-1807.
164. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV, et al. (2006) Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 480-489.

REFERENCES

165. Menard D, Matsika-Claquin MD, Djalle D, Yapou F, Manirakiza A, et al. (2005) Association of failures of seven-day courses of artesunate in a non-immune population in Bangui, Central African Republic with decreased sensitivity of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 73: 616-621.
166. Noedl H (2005) Artemisinin resistance: how can we find it? *Trends Parasitol* 21: 404-405.
167. Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, et al. (2009) Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS One* 4: e4551.
168. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, et al. (2012) Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379: 1960-1966.
169. WHO (2011) Global Plan for Artemisinin Resistance Containment (GPARC). Geneva: World Health Organization. 88 p.
170. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, et al. (2007) Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med* 4: e309.
171. Bjorkman A, Bhattarai A (2005) Public health impact of drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop* 94: 163-169.
172. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U (2004) History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* 17: 235-254.
173. Trape JF (2001) The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 64: 12-17.
174. Phillips M, Phillips-Howard PA (1996) Economic implications of resistance to antimalarial drugs. *Pharmacoeconomics* 10: 225-238.
175. Bloland PB, Ettling M (1999) Making malaria-treatment policy in the face of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 5-23.
176. Breman JG, Egan A, Keusch GT (2001) The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg* 64: iv-vii.
177. Vestergaard LS, Ringwald P (2007) Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J Trop Med Hyg* 77: 153-159.
178. Yeung S, Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Mills AJ, White NJ (2004) Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices. *Am J Trop Med Hyg* 71: 179-186.
179. Talisuna AO, Karema C, Ogutu B, Juma E, Logedi J, et al. (2012) Mitigating the threat of artemisinin resistance in Africa: improvement of drug-resistance surveillance and response systems. *Lancet Infect Dis* 12: 888-896.
180. Ridde V, Girard JE (2004) [Twelve years after the Bamako initiative: facts and political implications for equity in health services accessibility for indigent Africans]. *Sante Publique* 16: 37-51.
181. Fomba S, Xiao PM, Yan Y, Zhou H, Liu LQ (2010) Utilization and perception of the quality of curative care in community health centre of the fifth commune of Bamako. *East Afr J Public Health* 7: 148-152.
182. Ostroff SM, Kozarsky P (1998) Emerging infectious diseases and travel medicine. *Infect Dis Clin North Am* 12: 231-241.
183. Freedman DO, Kozarsky PE, Weld LH, Cetron MS (1999) GeoSentinel: the global emerging infections sentinel network of the International Society of Travel Medicine. *J Travel Med* 6: 94-98.

REFERENCES

184. Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, et al. (2006) Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med* 354: 119-130.
185. Danzon M (2004) ECDC and WHO: a common mission for better health in Europe. *Euro Surveill* 9: 2.
186. Desenclos JC, Bijkerk H, Huisman J (1993) Variations in national infectious diseases surveillance in Europe. *Lancet* 341: 1003-1006.
187. Jelinek T, Behrens R, Björkman A, Cochran, Matteelli (2000) European network on imported infectious disease surveillance. *European Quality Assurance News* 11: 170-172.
188. Jelinek T, Muhlberger N (2005) Surveillance of imported diseases as a window to travel health risks. *Infect Dis Clin North Am* 19: 1-13.
189. WHO (1964) Terminologie du paludisme et de l'éradication du paludisme. Geneva: World Health Organization. pp. 176.
190. WHO (2010) International Travel and Health. Geneva: World Health Organization. pp. 264.
191. Zuckerman JN (2002) Recent developments: Travel medicine. *BMJ* 325: 260-264.
192. Freedman DO, Woodall J (1999) Emerging infectious diseases and risk to the traveler. *Med Clin North Am* 83: 865-883, v.
193. Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, et al. (2002) Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis* 34: 572-576.
194. Askling HH, Nilsson J, Tegnell A, Janzon R, Ekdahl K (2005) Malaria risk in travelers. *Emerg Infect Dis* 11: 436-441.
195. Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Arnaud A, Cojean S, et al. (2007) Risk factors for imported fatal *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 13: 883-888.
196. Armengaud A, Legros F, Quatresous I, Barre H, Valayer P, et al. (2006) A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Euro Surveill* 11: E061116 061113.
197. Andriopoulos P, Economopoulou A, Spanakos G, Assimakopoulos G (2013) A local outbreak of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Laconia, Greece—a re-emerging infection in the southern borders of Europe? *Int J Infect Dis* 17: e125-128.
198. Florescu SA, Popescu CP, Calistru P, Ceausu E, Nica M, et al. (2011) *Plasmodium vivax* malaria in a Romanian traveller returning from Greece, August 2011. *Euro Surveill* 16.
199. InVS (2011) BHI du 21 au 27 Septembre 2011. *Bulletin Hebdomadaire International* 314.
200. WHO Europe the centralized information system for infectious diseases (CISID). Geneva.
201. Mali S, Steele S, Slutsker L, Arguin PM (2010) Malaria surveillance - United States, 2008. *MMWR Surveill Summ* 59: 1-15.
202. MacLean JD, Demers AM, Ndao M, Kokoskin E, Ward BJ, et al. (2004) Malaria epidemics and surveillance systems in Canada. *Emerg Infect Dis* 10: 1195-1201.
203. Anderson TJ, Roper C (2005) The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers. *Acta Trop* 94: 269-280.
204. Amin AA, Zurovac D, Kangwana BB, Greenfield J, Otieno DN, et al. (2007) The challenges of changing national malaria drug policy to artemisinin-based combinations in Kenya. *Malar J* 6: 72.

REFERENCES

205. Shretta R, Omumbo J, Rapuoda B, Snow RW (2000) Using evidence to change antimalarial drug policy in Kenya. *Trop Med Int Health* 5: 755-764.
206. CNRPaludisme (2011) Rapport d'activités année 2010. France: InVS. pp. 64.
207. Smith AD, Bradley DJ, Smith V, Blaze M, Behrens RH, et al. (2008) Imported malaria and high risk groups: observational study using UK surveillance data 1987-2006. *BMJ* 337: a120.
208. Londono BL, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Chattopadhyay C, et al. (2009) Chloroquine-resistant haplotype *Plasmodium falciparum* parasites, Haiti. *Emerg Infect Dis* 15: 735-740.
209. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrees du Lou A, et al. (1998) Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C R Acad Sci III* 321: 689-697.
210. Mengesha T, Makonnen E (1999) Comparative efficacy and safety of chloroquine and alternative antimalarial drugs: a meta-analysis from six African countries. *East Afr Med J* 76: 314-319.
211. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, Kiara SM, Ward S, et al. (2009) Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J* 8: 106.
212. Hastings IM, Ward SA (2005) Coartem (artemether-lumefantrine) in Africa: the beginning of the end? *J Infect Dis* 192: 1303-1304; author reply 1304-1305.
213. Walliker D, Hunt P, Babiker H (2005) Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop* 94: 251-259.
214. Bruce-Chwatt LJ (1984) Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication era. *Bull World Health Organ* 62 Suppl: 19-29.
215. Bruce-Chwatt LJ (1969) Malaria eradication at the crossroads. *Bull N Y Acad Med* 45: 999-1012.
216. Bruce-Chwatt LJ (1956) Chemotherapy in relation to possibilities of malaria eradication in tropical Africa. *Bull World Health Organ* 15: 852-862.
217. Ekdahl K, Andersson Y (2005) The epidemiology of travel-associated shigellosis--regional risks, seasonality and serogroups. *J Infect* 51: 222-229.
218. Guerin PJ, Grais RF, Rottingen JA, Valleron AJ (2007) Using European travellers as an early alert to detect emerging pathogens in countries with limited laboratory resources. *BMC Public Health* 7: 8.
219. Taniguchi H, Nakano T, Katayama Y, Harada F, Arai Y, et al. (2005) Sentinel surveillance for international *Shigella* by a quarantine station in Japan. *Epidemiol Infect* 133: 611-615.
220. Ekdahl K, Giesecke J (2004) Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, campylobacter and giardia infection as examples. *Euro Surveill* 9: 6-9.
221. Kean BH (1979) Chloroquine-resistant *falciparum* malaria from Africa. *JAMA* 241: 395.
222. Moran JS (1983) Failure of chloroquine prophylaxis in *Plasmodium falciparum* in Zaire. *Lancet* 2: 171-172.
223. Le Bras J, Decazes JM, Deloron P, Verdier F, Modai J (1984) R-II chloroquine-resistant *falciparum* malaria from Burundi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 410-411.
224. Le Bras J, Coulaud JP, Bricaire F, Le Bras M, Roue R, et al. (1985) Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in the Congo. *Lancet* 2: 1071.
225. Olsen VV, Jensen T, Jorgensen M (1984) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Angola. *Lancet* 1: 1462-1463.
226. Neequaye J, Coene J, Taelman H, Wéry M, Greenberg AE, et al. (1986) In vivo chloroquine-resistant *falciparum* malaria in western Africa. *Lancet* 1(0): 2.
227. Le Bras J, Hatin I, Bouree P, Coco-Cianci O, Garin JP, et al. (1986) Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Benin. *Lancet* 2: 1043-1044.

REFERENCES

228. Charmot G, Le Bras J, Doury JC, Baudon D, Roue R, et al. (1988) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria from Ivory Coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 392-393.
229. Chabasse D, De Gentile L, Ligny C, Le Bras J, Riolland X, et al. (1988) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Mali revealed by congenital malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 547.
230. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R (1999) Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ* 77: 560-566.
231. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, et al. (2004) Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305: 1124.
232. WHO (2010) World malaria report 2010. World Health Organization ed. Geneva: World Health Organization. pp. 238.
233. Maude RJ, Pontavornpinyo W, Saralamba S, Aguas R, Yeung S, et al. (2009) The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. *Malar J* 8: 31.
234. White NJ (2010) Artemisinin resistance--the clock is ticking. *Lancet* 376: 2051-2052.
235. Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, et al. (2010) Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* 8: 272-280.
236. Yeung S, Van Damme W, Socheat D, White NJ, Mills A (2008) Access to artemisinin combination therapy for malaria in remote areas of Cambodia. *Malar J* 7: 96.
237. Rathod PK, McErlean T, Lee PC (1997) Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9389-9393.
238. Castellini MA, Buguliskis JS, Casta LJ, Butz CE, Clark AB, et al. (2011) Malaria drug resistance is associated with defective DNA mismatch repair. *Mol Biochem Parasitol* 177: 143-147.
239. Enserink M (2010) If artemisinin drugs fail, what's plan B? *Science* 328: 846.
240. Williams HA, Durrheim D, Shretta R (2004) The process of changing national malaria treatment policy: lessons from country-level studies. *Health Policy Plan* 19: 356-370.
241. Fevre EM, Barnish G (1999) Malaria-treatment policies: when and how should they be changed? *Ann Trop Med Parasitol* 93: 549-560.
242. Kitua AY (1999) Antimalarial drug policy: making systematic change. *Lancet* 354 Suppl: SIV32.
243. Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner S, Saunders D, et al. Artesunate dose escalation for the treatment of uncomplicated malaria in a region of reported artemisinin resistance: a randomized clinical trial. *PLoS One* 6: e19283.
244. Arrow KJ (2004) Uncertainty and the welfare economics of medical care. 1963. *Bull World Health Organ* 82: 141-149.
245. Enserink M (2012) Malaria. As drug pilot wraps up, a lively debate about its future. *Science* 338: 732-733.
246. Carr A, Amin J (2009) Efficacy and tolerability of initial antiretroviral therapy: a systematic review. *AIDS* 23: 343-353; discussion 355-346.
247. Grant A, Gothard P, Thwaites G (2008) Managing drug resistant tuberculosis. *BMJ* 337: a1110.
248. Boni MF, Smith DL, Laxminarayan R (2008) Benefits of using multiple first-line therapies against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14216-14221.
249. Smith DL, Klein EY, McKenzie FE, Laxminarayan R Prospective strategies to delay the evolution of anti-malarial drug resistance: weighing the uncertainty. *Malar J* 9: 217.

10 - ANNEXES

- PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS -

PUBLICATIONS DANS LE CADRE DE LA THESE

Gharbi M, Flegg J, Pradines B, Berenger A, Ndiaye M, Djimdé A, Roper C, Hubert V, Kendjo E, Legros F, Venkatesan M, Brasseur P, Gaye O, Touré Offianan A, Penali L, Le Bras J, Guerin PJ. Surveillance of travellers: an additional tool for tracking antimalarial drug resistance in endemic countries. Soumis Plos one. April 2013

Gharbi M, Pillai DR, Rachel L, Khairnar K, Hubert V, Kendjo E, Dahlström S, Existe A, Guerin PJ, Le Bras J. Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum malaria in travellers from Haiti after the 2010 earthquake. Emerg Infect Dis. 2012; 18 (8) :1346-9. doi: 10.3201/eid1808.111779.

Gharbi M, Flegg JA, Hubert V, Kendjo E, Metcalf JE, Bertaux L, Guérin PJ, Le Bras J; Members of the French National Reference Centre for Imported Malaria Study. Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of Plasmodium falciparum in isolates from travellers returning from West and Central Africa, 2000-2011. Malar J. 2013 Jan 25;12(1):35. doi: 10.1186/1475-2875-12-35.

Flegg JA, Metcalf JE, **Gharbi M**, Venkatesan M, Shewchuk T, Sibley CH, Guerin PJ. Trends in antimalarial drug use in Africa. Soumis Lancet Infectious Diseases. February 2013

COMMUNICATIONS ORALES

Gharbi M, Flegg JA, Hubert V, Kendjo E, Metcalf JE, Guérin PJ, Le Bras J. Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of P. falciparum isolates from travellers returning from West Africa between 2000-2011 – 60th annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygien (ASTMH), November 2012, Atlanta, USA

Gharbi M, Flegg J, Ndiaye M, Pradines B, Roper C, Hubert V, Kendjo E, Brasseur P, Gaye O, Djimdé A, Berenger A, Offianan AT, Le Bras J, Penali L, Guerin PJ. Traveller's surveillance: a tool for detecting emergence of antimalarial drug resistance in endemic countries, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene biennial meeting: 'Discovery and Delivery of New Paradigms for Global Health, September 2012, London, UK

Gharbi M, Pradines B, Kendjo E, Hubert V, Guerin PJ, Le Bras J. Use of malaria imported cases in non endemic countries to assess the return of chloroquine susceptibility of P. falciparum strains from Senegal - 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health, October 2011, Barcelona, Spain

Gharbi M, Pradines B, Kendjo E, Hubert V, Guerin PJ, Le Bras J. Use of malaria imported cases in non endemic countries to assess the return of chloroquine susceptibility of P. falciparum strains from Senegal – Congress of the International Society of Travel Medicine (CISTM), Mai 2011, Boston, USA

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Gharbi M, Flegg JA, Ndiaye M, Pradines B, Roper C, Hubert V, Kendjo E, Brasseur P, Gaye O, Djimdé A, Berenger A, Offianan A T, Penali L, Le Bras J, Guerin P J. Traveler's surveillance: a tool for detecting emergence of antimalarial drug resistance in endemic countries – 60th annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygien (ASTMH), November 2012, Atlanta, USA

Gharbi M, Flegg JA, Hubert V, Kendjo E, Metcalf JE, Guerin JP, Le Bras J. Longitudinal study assessing the return of chloroquine susceptibility of Plasmodium falciparum isolates from travelers returning from West Africa - Challenges in malaria research, 10-12 October 2012, Basel, Switzerland.

Gharbi M, Pillai DR, Rachel L, Khairnar K, Hubert V, Kendjo E, Dahlström S, Existe A, Guerin PJ, Le Bras J. Identification of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum malaria in Haiti after the 2010 earthquake – 59th annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygien (ASTMH), December 2011, Philadelphia, USA

Gharbi M, Lau R, Hubert V, Thellier M, Pradines B, Kendjo E, Guérin PJ, Le Bras J, Pillai DR. Chloroquine resistance in Haiti : Lessons learned from imported cases – 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health (ECTMIH), October 2011, Barcelona, Spain

Gharbi M, Guerin PJ, Sutherland CJ, Pillai DR, Kendjo E, Le Bras J. Imported case surveillance: a tool for detecting the emergence of malarial drug resistance – 59th annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygien (ASTMH), November 2010, Atlanta, USA

- ANNEXE 1 –

**Dictionnaire de variables communes pour une surveillance internationale du
paludisme d'importation**

ANNEXES

Table	Label	Variable	Unit	Definition
subject	Center study ID	study_id		Number or code that corresponds to the number of center study
subject	Location study	study_loc		Country where the study takes place (international code in 2 letters)
subject	Patient ID	patient_id		Patient ID generated by the center study
subject	Gender	gender		Gender
subject	Pregnant	Pregnant		pregnant? Y or N
subject	Date of birth	dtbirth	dd/mm/yyyy	Date of birth of the patient
subject	Residence country	res_country		Country of residence (international code in 2 letters)
subject	Endemic country	end_country		Country of contamination (international code in 2 letters)
subject	Date of departure	dt_depart	dd/mm/yyyy	Date of departure to the endemic country
subject	Date of return	dt_return	dd/mm/yyyy	Date of the return from endemic country
subject	Duration of stay	dur_stay	day	Duration of stay in endemic country (number of days)
subject	Reason for travel	reason_travel		Reason for travel: 1=visiting family in country of origin 2=expatriate living abroad 3=Civilian sea/ air crew 4=Military 5=Business 6=Tourism 7=Other
subject	Date_first_consultation	dt_consultationD0	dd/mm/yyyy	Date of the first consultation (day 0)
subject	Date_onset_symptoms	dt_onset_symp		Date of onset of illness
subject	Clinical_classificationD0	Clinic_class		clinical classification at day 0: 1=severe malaria 2= uncomplicated malaria
Parasito diagnosis	Date of lab diagnosis	dtdiag	dd/mm/yyyy	Date of laboratory diagnosis
Parasito diagnosis	Method of diagnosis	methdiag		Method of diagnosis: 1=Blood film 2=Antigen test 3=clinical 4=other
Parasito diagnosis	Plasmodial species	pspecies		Plasmodial species causing the infection: 1=falciparum 2=vivax 3=ovale 4=malariae 5=knowlesi 6=spp (others)
Parasito diagnosis	Thin_blood_slides	bloodfilm		Thin blood slides : 1=trophozoite/schizonte 2=gametocytes 3=not realised 4=negative
Parasito diagnosis	Thin_blood_slides_density	bloodfilm_den	%	Thin blood slides : parasitemia density = number of infected erythrocytes over total number of red blood cells
Parasito diagnosis	Thin_blood_slides_density_mcl	bloodfilm_den_mcl	µl	Thin blood slides : parasitemia density per microliter = number of infected erythrocytes per microliter of blood (automatic calculation)
Parasito diagnosis	Thick_blood_slides	thickblood		thick blood slides: 1=only gametocyte 2=not realised 3=negative
Parasito diagnosis	Thick_blood_slides_density	thickblood_den		thick blood slides : number of parasites per 1000 white blood cell
Parasito diagnosis	Thick_blood_slides_density_mcl	thickblood_den_mcl	µl	thick blood slides : parasitemia density per microliter = Number of parasite per microliter of blood (automatic calculation)
Treatment	Prophylaxis taken	prophy		Prophylaxis taken: 1=Yes 2=No 3=unknown
Treatment	Prophylaxis_treatment	prophy_treatment		Prophylactic treatment: name of molecule

ANNEXES

Treatment	Curative treatment	cur_treat		Curative treatment: 1=Yes 2=No 3=Unknown
Treatment	First_intention_treatment_molecule	first_cur_treat_mol		First intention curative treatment: name of molecule
Treatment	First_treatment_dose	first_cur_treat_dose	mg/day	Dose of the first intention curative treatment
Treatment	First_treatment_date_start	first_cur_treat_dtstart	dd/mm/yyyy	Date of the beginning of first intention treatment
Treatment	First_treatment_date_end	first_cur_treat_dtend	dd/mm/yyyy	Date of the end of the first intention treatment
Treatment	Second_intention_treatment_molecule	scnd_cur_treat_mol		Second intention curative treatment molecule: name of molecule
Treatment	Second_treatment_dose	scnd_cur_treat_dose	mg/day	Dose of the second intention curative treatment
Treatment	Second_treatment_date_start	scnd_cur_treat_dtstart	dd/mm/yyyy	Date of the beginning of second intention treatment
Treatment	Second_treatment_date_end	scnd_cur_treat_dtend	dd/mm/yyyy	Date of the end of the second intention treatment
Response treatment	to D3D4_control	D3D4cont		Parasitological control realised at day 3 or 4?: 1=Yes 2=No 3=unknown
Response treatment	to D3D4_parasite_control	D3D4_para_cont		Results of parasitological control at day 3 or 4: 1=absence 2=trophozoite 3=only gametocyte
Response treatment	to D3D4_density_parasite_control	D3D4_dens_para		Parasitological density at day 3 or 4 (μ l): 1= \leq 100 2= 101-10000 3= >10000
Response treatment	to D3D4_temperature_control	D3D4_temp_cont		Temperature at day 3 or 4
Response treatment	to D6D8_control	D6D8cont		Parasitological control realised at day 6-8?: 1=Yes 2=No 3=unknown
Response treatment	to D6D8_parasite_control	D6D8_para_cont		Results of parasitological control at day 6-8: 1=absence 2=trophozoite 3=only gametocyte
Response treatment	to D6D8_density_parasite_control	D6D8_dens_para		Parasitological density at day 6-8 (μ l): 1= \leq 100 2= 101-10000 3= >10000
Response treatment	to D6D8_temperature_control	D6D8_temp_cont		Temperature at day 6-8
Response treatment	to D26D30_control	D26D30cont		Parasitological control realised at day 26-30?: 1=Yes 2=No 3=unknown
Response treatment	to D26D30_parasite_control	D26D30_para_cont		Results of parasitological control at day 26-30: 1=absence 2=trophozoite 3=only gametocyte
Response treatment	to D26D30_density_parasite_control	D26D30_dens_para		Parasitological density at day 26-30 (μ l): 1= \leq 100 2= 101-10000 3= >10000
Response treatment	to D26D30_temperature_control	D26D30_temp_cont		Temperature at day 26-30

ANNEXES

Response treatment	to	DOther_control	Dother_cont		Parasitological control realised at another day?: 1=Yes 2=No 3=unknown
Response treatment	to	DOther_day	Dother_day		Day of the parasitological control if it is a day different from D3, D7 or D28
Response treatment	to	DOther_parasite_control	Dother_para_cont		Results of parasitic control at another day: 1=absence 2=trophozoite 3=only gametocyte
Response treatment	to	DOther_density_parasite_control	Dother_dens_para		Parasitological density at another day (µl): 1= ≤100 2= 101-10000 3= >10000
Response treatment	to	DOther_temperature_control	Dother_temp_cont		Temperature at another day
Response treatment	to	clinical_evolution	clinic_evol		Clinical evolution of the patient: 1=recovery 2=death 3=unknown
In vitro sample		Date sample	dtsample	dd/mm/yyyy	Date of the sample
In vitro sample		Sample ID	sample_id		Sample ID generated by the study center
In vitro sample		Sample parasitemia	sample_paras	%	sample parasitemia
In vitro sample		Sample adjusted parasitemia	sample_adj_paras	%	sample parasitemia adjusted to obtain a parasitemia <1%
Phenotyping		Molecule [1-20]	mol		Name of tested molecule
Phenotyping		IC50 isolate estimation	lc50_est	nanoM / L	Estimated concentration for each drug required to inhibit parasite growth by 50% compared with the same sample grown without drug (for the isolate)
Phenotyping		IC50 Std error	IC50std		IC 50 standard deviation error
Genotyping		Pfcrt76	crt76		
Genotyping		Pfdhfr51	dhfr51		
Genotyping		Pfdhfr59	dhfr59		
Genotyping		Pfdhfr108	dhfr108		
Genotyping		Pfdhfr164	dhfr164		
Genotyping		Pfdhps436	dhps436		
Genotyping		Pfdhps437	dhps437		
Genotyping		Pfdhps540	dhps540		
Genotyping		number of pfmdr1 copies	nb_mdr1_copies		

- ANNEXES 2, 3, 4 –

**Fiches de déclaration des cas de paludisme
en France, au Royaume-Unis et au Canada**

Année :

ID patient :

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

 (JJ/MM/AAAA)

à défaut Age :

Sexe :

 M F NSP

Ethnicité :

 Caucasiens Asiatique Africain Africain vivant en France Autre NSP Africain vivant en Afrique

Pays de naissance :

Pays de résidence :

(durant les 12 derniers mois)

Pays d'endemie visité(s) correspondant à l'épisode actuel :

1: 2:

Date départ :

 (JJ/MM/AAAA)

Date retour :

 (JJ/MM/AAAA)

Durée du séjour : (si dates précises inconnues)

 1 semaine ou moins 2 semaines 3 semaines 4 semaines 1 à 3 mois > 3 mois NSP

Autres pays d'endemie visités durant les 4 dernières années :

 Oui Non NSP1: 2:

Nature du séjour :

 Tourisme Affaires / Professionnels Migrants en visite au Pays d'origine Navigants, Marins Résident ou expatriés ≥ 6 mois Routard et/ou conditions de séjour précaires Militaires NSP Autres

Si militaire, unité :

Si autres, préciser :

Résidence durant le séjour en zone d'endémie :

 Urbain strict Rural Itinérant / Mixte NSP

Fréquence des séjours en zone d'endémie durant les 12 mois précédents :

 1 ou moins > 1 NSP

Date des Premiers Symptomes de cet accès :

 (JJ/MM/AAAA)

Patient adressé par un médecin :

 Oui Non NSP

Y a-t-il eu une consultation médicale avant la présente consultation ?

 Oui Non NSP

Si OUI, à quelle date

 (JJ/MM/AAAA)

où ?

 Libéral Hospitalier

A cette occasion une recherche biologique de Paludisme a-t-elle été réalisée ?

 Oui Non

Si OUI, résultat :

 Positif Négatif Résultat non connu

Date de la consultation actuelle : (JJ/MM/AAAA)**Etat clinique au moment du diagnostic :**

- Accès simple sans vomissements
 Accès simple AVEC vomissements
 Formes Asymptomatiques et découvertes fortuites
 Accès GRAVE (joindre CR hospitalisation SVP)
 Paludisme Viscéral évolutif (PVE)

Critères de gravité (joindre CR Hospitalisation, SVP)**Cliniques :**

- Troubles de la conscience minimes (Obnubilation, Prostration, Coma stade 1, score de Glasgow < 10)
 Coma avéré (sans signe d'éveil aux stimulations)
 Convulsions répétées (> 2 par 24h)
 Etat de choc
 Syndrome hémorragique (y compris CIVD)
 Détresse respiratoire (SDRA, œdème du poumon)
 Acidose métabolique (pH < 7,35)
 Hyperlactatémie (lactates plasmatiques > 5 mmol/l)
 Hémoglobinurie
 Ictère (clinique ou bilirubine > 50 µmol/l)

Biologiques :

- Parasitémie > 4% (chez le non-immun, au associée à au moins un autre signe de gravité)
 Hémoglobine < 5g/dl (critère OMS strict)
 Hémoglobine < 8g/dl (patient voyageur résidant Hors Zone Endémique)
 Créatininémie valeur > 265 µmol/l (critère OMS) ou insuffisance rénale aiguë organique considérée comme critère de gravité par le clinicien
 Glycémie valeur ≤ 2,2 mmol/l ou glycémie considérée comme critère de gravité par le clinicien
 Bilirubine totale ≥ 50 µmol/l
 Autre(s) critère(s) de gravité selon le clinicien

Si créatininémie, valeur créatininémie

Dialyse

 Oui Non

Si glycémie valeur glycémie

Si autres critères de gravité, préciser

Antécédents de paludisme dans les 3 derniers mois

 Oui Non NSP

S'agit-il d'une femme enceinte ou parturiente ?

 Oui Non NSP

S'agit-il d'un patient ayant une immunodépression connue ?

 Oui Non NSP

Préciser :

Paludismes "autochtones" (adresser un formulaire de DO à votre DDASS) Oui Non Congénital Accidentel (AES, Greffe,...) Transfusionnel Aéroportuaire Suspicion d'autochtone vrai Cryptique

Date du Diagnostic Biologique : (JJ/MM/AAAA)Espèce(s) Plasmodiale(s) : *P. falciparum* *P. ovale* *Plasmodium spp*
 P. vivax *P. malariae*Hémoglobine (g/l) : valeurs usuelles 120-170GR(tera/l) : valeurs usuelles 4,50-5,80GB(giga/l) : valeurs usuelles 4,00-10,00Plaquettes (giga/l) : valeurs usuelles 150-450

Frottis mince

 Trophozoïtes/schizontes Gaméto seuls Non fait Négatif

Statut

Densité parasitaire

 % μ litre

Goutte épaisse

 Trophozoïtes/schizontes Gaméto seuls Non fait Négatif /1000 GB μ litreBandelettes (HRP2, LDH, ...) Fait Non faitSi fait : positif Ag *P. falciparum* positif Ag commun Ag autres espèces

Autres techniques

Préciser : PCR QBC Sérologie Autres

Commentaire :

Lame transmise par autre Labo : Oui Non

Protection Personnelle Anti-Moustiques :

 Oui Non NSPRépulsifs cutanés Sans autre indication Régulier EpisodiqueMoustiquaires de lit Sans autre indication Régulier EpisodiqueAutres, préciser Sans autre indication Régulier EpisodiqueChimio prophylaxie utilisée : Oui Non NSP

(mettre une croix la case appropriée)	Sans autre indication	Régulier	Occasionnel	Arrêt prématuré (au retour)	NSP
Atovaquone + Proguanil (Malarone®)					
Méfloquine (Lariam®)					
Doxycycline (Doxypalu®, ...)					
Chloroquine + Proguanil (ou Savarine®)					
Chloroquine (Nivaquine®)					
Proguanil (Paludrine®)					
Autre, préciser <input type="text"/>					

Date de la dernière prise médicamenteuse prophylactique : (JJ/MM/AAAA)Arrêt de la prise suite à intolérance/effet(s) secondaire(s) : Oui Non NSP

Utilisation traitement à visée Curative du paludisme dans les 30 derniers jours ?

Oui Non NSP

Traitement : CODE

Date (JJ/MM/AAAA)

Si autre, lequel

Prise en charge & traitement

Date de la première prise médicamenteuse dans votre structure de soin : (JJ/MM/AAAA)

Ambulatoire Hospitalisation

Nombre de jours d'hospitalisation : dont réanimation/SI :

Transfert autre hôpital Pas de traitement

Evolution clinique (si DECES, joindre CR Hospitalisation, SVP) :

Guérison DECES

Poids (Kgs) :

Traitement anti-palustre de 1ère intention : CODE

Si autre préciser :

Effet indésirable ? Non Mineur Grave

Ayant entraîné un changement de molécule

Traitement débuté le : Matin Midi Soir

Dose totale (mg/J) : ou Nb total Cpés/J

Durée en jours :

Médicament de 2nde intention ou de relais : CODE

Si autre préciser :

Effet indésirable ? Non Mineur Grave

Ayant entraîné un changement de molécule

Traitement débuté le : Matin Midi Soir

Dose totale (mg/J) : ou Nb total Cpés/J

Durée en jours :

Commentaires & remarques :

CODE	Médicaments - Traitement
A	Chloroquine (Nivaquine®)
B	Méfloquine (Lariam®)
C	Atovaquone + Proguanil (Malarone®)
D	Doxycycline (Doxypalu®)
E	Quinine IV
F	Quinine IV avec dose de charge
G	Quinine IV avec antibiotique (cycline, ...)
H	Quinine IV avec dose de charge + antibiotique
I	Quinine per os
J	Halofantrine (Halfan®)
K	Artemether + Lumefantrine (Coartem®, Riamet®)

Contrôle parasitologique *P falciparum*

Oui Non

	Fait	Température	Parasitologie			Densité parasitaire (µlitre)		
J3 ou J4	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> absence	<input type="checkbox"/> trophos	<input type="checkbox"/> gaméto seuls	<input type="checkbox"/> ≤ 100	<input type="checkbox"/> 101-10 000	<input type="checkbox"/> > 10 000
J7 +/-1	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> absence	<input type="checkbox"/> trophos	<input type="checkbox"/> gaméto seuls	<input type="checkbox"/> ≤ 100	<input type="checkbox"/> 101-10 000	<input type="checkbox"/> > 10 000
J28 +/-2	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> absence	<input type="checkbox"/> trophos	<input type="checkbox"/> gaméto seuls	<input type="checkbox"/> ≤ 100	<input type="checkbox"/> 101-10 000	<input type="checkbox"/> > 10 000
Autre	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> absence	<input type="checkbox"/> trophos	<input type="checkbox"/> gaméto seuls	<input type="checkbox"/> ≤ 100	<input type="checkbox"/> 101-10 000	<input type="checkbox"/> > 10 000

Prélèvement pour CNR le (JJ/MM/AAAA) à : envoyé le : (JJ/MM/AAAA)

Sang Plasma Buvard

Commentaires & remarques :

Perdu de vue

Your Reference No.

MRL No. ___ / ___

**HEALTH PROTECTION AGENCY
MALARIA REFERENCE LABORATORY
PATIENT REPORT FORM**

In Confidence

Date -----/-----/-----

Family name: _____

All other names: _____

Home post code:

Primary Care Trust:

Address in U.K.: _____

Date of birth: ___ / ___ / ___ Age _____ Sex: M / F

Country of birth: _____ Country of usual residence: _____

Ethnicity:(mark one) <input type="checkbox"/> White British <input type="checkbox"/> Other White background <input type="checkbox"/> Black African <input type="checkbox"/> Black Caribbean <input type="checkbox"/> Other Black background <input type="checkbox"/> Indian Sub-Continent <input type="checkbox"/> South-East Asian <input type="checkbox"/> Other Asian background <input type="checkbox"/> Mixed ethnicity <input type="checkbox"/> Other (please specify)	Reason for travel:(mark one) <input type="checkbox"/> New Entrant to UK <input type="checkbox"/> Visiting family in country of origin <input type="checkbox"/> UK citizen living abroad <input type="checkbox"/> Civilian sea/air crew <input type="checkbox"/> British armed forces <input type="checkbox"/> Business/Professional travel <input type="checkbox"/> Foreign student studying in UK <input type="checkbox"/> Holiday travel to malarious country <input type="checkbox"/> Foreign visitor ill while in UK <input type="checkbox"/> Children visiting parents living abroad <input type="checkbox"/> Other (please specify) _____	Malaria prophylaxis taken:(mark as relevant) <input type="checkbox"/> NONE <input type="checkbox"/> Mefloquine (Lariam) <input type="checkbox"/> Malarone <input type="checkbox"/> Doxycycline <input type="checkbox"/> Chloroquine (Nivaquine/Avloclor) <input type="checkbox"/> Proguanil (Paludrine) <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Other _____ Prophylaxis taken regularly? Y / N Continued on return for _____ weeks
---	---	---

Date of onset of illness: ___ / ___ / ___ Date of starting treatment: ___ / ___ / ___

Date of arrival in U.K. from malarious country: ___ / ___ / ___

Duration of stay abroad : _____

For India, please specify areas visited

Country (ies) where infection acquired : _____

G.P. Name & Address: Tel.No.	Name & Contact Details of person completing this form if not the G.P.
---	--

Laboratory/Hospital where diagnosis made: _____

Date of diagnosis: ____/____/____

Date of sample: ____/____/____

Method of diagnosis: Blood film Antigen test Clinical
please specify _____

Species of malarial parasite:

- P.falciparum P.ovale
 P.vivax Species unknown
 P.malariae No malaria parasites found

Was patient treated as an outpatient inpatient Was this patient admitted to ITU/HDU? Y/N
Duration of stay in hospital _____ days.
Pregnant? Y/N -----/40

Outcome of illness: Recovery Death Unknown

Any other information relevant to this case: _____

MALARIA IS A NOTIFIABLE DISEASE- PLEASE FILL IN A STATUTORY NOTIFICATION FORM AND FORWARD TO THE CCDC.

Please return this form to:

**HPA Malaria Reference Laboratory
London School of Hygiene & Tropical Medicine
Keppel Street (Gower Street)
London WC1E 7HT**

Tel. no: surveillance 020 7927 2435
laboratory 020 7927 2427
fax 020 7637 0248

If sending slides, please indicate where and to whom results should be sent.

MALARIA LAB. USE ONLY



MALARIA PCR ORDER FORM

Ship To: **Edmonton**
 ProvLab
 Walter Mackenzie Health Sciences Centre
 University of Alberta Hospitals
 8440-112 Street
 Edmonton, Alberta
 T6G 2J2

OR **Calgary**
 ProvLab
 3030 Hospital Drive NW
 Calgary, Alberta
 T2N 4W4

PLEASE PROVIDE ALL INFORMATION

Submitting Physician:

Ordering Physician: _____ LAST _____ FIRST

Address: _____ Complete address including postal code

Phone Number: _____

Additional Copy To:

Name: _____ LAST _____ FIRST

Address: _____ Complete address including postal code

Fax # [BY SPECIAL REQUEST ONLY *]: _____

Patient Information:

Patient Name: _____ LAST _____ FIRST

PHN/Hospital # _____

DOB: DD / MM / YYYY Male Female

Patient Address: _____

Specimen: [Minimum Amount 1 ml]

EDTA Blood - Frozen or Cold

DATE COLLECTED			DATE SENT		
DD	MM	YYYY	DD	MM	YYYY
TIME (24HRS)			TIME (24HRS)		

Country of acquisition/relevant travel:

Fever: YES NO

Clinical details/comments:

Prophylaxis/Treatment:

Blood Smear result:

Species/suspected species:

Diagnostic stages seen:

Parasitemia (%):

Comments:

* Fax Special Request - please call (780)407-7121 in Edmonton or (403)944-1200 in Calgary

THIS FORM MUST ACCOMPANY THE SPECIMEN.

- ANNEXES 5 –

Les nouvelles molécules actuellement en cours de développement

Global Portfolio, 2012

Research		Translational		Development		
Lead Optimisation	Preclinical	Phase I	Phase IIa	Phase IIb/III	Registration	Phase IV
Oxaboroles Anacor	DSM265 (UTSW/UW/ Monash)	GNF156 Novartis	OZ439 (Monash/UNMC/ STI)	Azithromycin chloroquine Pfizer	Mefloquine Artesunate Farnaoquinols/DNDI	Coartem®-D Novartis
DHODH UTSW/UW/Monash	P218 DHFR (Biotech/Monash/ LSHTM)	Antimalarial Actelion	NITD609 Novartis	Tafenoquine GSK	Artesunate i.r. WHO/JDR	Artesunate for injection Gullin
Heterocycles TCG Lifesciences	ELQ-300 (USF/ OHSU-VAMC)	CDRI 97-78 Ipsca	Ferroquine Sanofi	Pyramax Paediatric Shin Poona/ University of Iowa	Eurartesim® Sigma-Tau	Eurartesim® Sigma-Tau
Pyrazoles DrexelMed/UW	21A092 (DrexelMed/UW)	DF02 Dilafor	Fosmidomycin Piperazine Jomaa Pharma GmbH	Eurartesim® Paediatric Sigma-Tau	Pyramax Shin Poona/ University of Iowa	Pyramax Shin Poona/ University of Iowa
Heterocycles Dundee	MMV390048 (UCT)	N-tert butyl isoquine Liverpool STM/GSK	Methylene Blue AQ Lini, Heidelberg	<i>Nauclaea pobeguini</i> DRC/Antwerp	ASAQ Winthrop sanofi /DNDI	ASAQ Winthrop sanofi /DNDI
Cell based lead Merck Sereono /WHO/JDR	NPC-1161-B University of Mississippi	AQ13 Immtech	SAR97276 Sanofi	<i>Argemone mexicana</i> Mali/Geneva	SP-AQ Gullin	SP-AQ Gullin
Imidazolidinediones WRAIR	RKA182 Liverpool STM		Artemisone UHKST	Arterolane/PQP Ranbaxy		
dUTPase inhibitors Medivir	BCX4945 Biocyst/Albert Einstein College of Medicine			Co-trimoxazole Bactrim Institute of Tropical		
	SAR116242 Palumed			ARCO Naphthoquine/ Artemisinin		
				ArtiMist™ Proto Pharma		

Included in MMV portfolio post registration

Non MMV