

## THÉRAPEUTIQUE/THERAPEUTICS



Surveillance de l'efficacité des associations artémether-luméfantrine et artésunate/sulfadoxine-pyriméthamine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* à Boali, République centrafricaine

Monitoring the efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-sulfadoxine/pyrimethamine combinations for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Boali, Central African Republic

André DIAMAN-RONSONE, Hilary Bienvenue NAMBEI-MBOIFIO, Romaric NZOUMBOU-BOKO, Simon POUNGUINZA, Martin ZÉKANA, Jean de Dieu LONGO, Wilfrid Sylvain NAMBEI\*

**RÉSUMÉ** **Objectif.** Surveiller l'efficacité des associations thérapeutiques artémether-luméfantrine (AL) et artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP) dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 6 mois à 14 ans à Boali, République centrafricaine.

**Méthodes.** Étude transversale randomisée simple réalisée du 24 août au 27 novembre 2024 chez 199 enfants de 6 mois à 14 ans pris en charge pour accès palustre simple à Boali. Parmi ces enfants, 101 ont été traités par AL et 98 par ASSP avec un suivi pendant 28 jours. La répartition a été faite au hasard. Les réponses ont été classées selon les critères de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en réponses clinique et parasitologique adéquates (RCPA), en échec thérapeutique précoce (ETP), en échec parasitologique tardif (EPT) et en échec clinique tardif (ECT). L'ADN parasite a été extrait en utilisant le kit QIAGEN. Les marqueurs de résistance *dhfr*, *dhps* et *Kelch 13* ont été analysés par la PCR. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé.

**Résultats.** Pour AL et ASSP, la RCPA était respectivement de 81,8 % et 81,7 %. Il n'y avait pas de différence significative dans la réduction de l'anémie, de la fièvre et la parasitémie entre les deux groupes ( $p > 0,05$ ). Les mutants *dhfr*-N51I-C59R-S108N-*dhps*-S436A (66,7 %) étaient majoritaires. Le polymorphisme des gènes *K13* a montré 9 mutations synonymes : A621A, A627A, D646D, G496G, G690G, Q707Q, S425S et 4 mutants non synonymes : A578S, V589I, V520I/V637I.

**Conclusion.** Cette étude montre que des plasmodies porteuses de mutations synonymes et non synonymes ont été détectées, d'où la nécessité de continuer à surveiller régulièrement ces marqueurs de résistance.

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, Accès simple, Traitement, Artémether-luméfantrine, Artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine, Marqueurs de résistance, Diversité génétique, République centrafricaine, Afrique subsaharienne

**ABSTRACT** **Objective.** To evaluate the effectiveness of artemether-lumefantrine (AL) and artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (ASSP) for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children aged 6 months to 14 years in Boali, Central African Republic.

**Methods.** From August 24 to November 27, 2024, a simple randomized cross-sectional study was conducted among 199 children aged 6 months to 14 years who were treated for uncomplicated *falciparum* malaria in Boali. One hundred and one children were treated with AL, and 98 with ASSP. All children were followed up for 28 days. Assignment to treatment groups was randomized. Responses were classified according to World Health Organization (WHO) criteria as adequate clinical and parasitological responses (ACPR), early treatment failure (ETF), late parasitological failure (LPF), and late clinical failure (LCF). Parasite DNA was extracted using a QIAGEN kit. The resistance markers *dhfr*, *dhps*, and *kelch13* were analyzed by PCR. Spearman's correlation test was used.

**Results.** The ADR was 81.8% and 81.7% for AL and ASSP, respectively. There was no significant difference in the reduction of anemia, fever, or parasitemia between the two groups ( $p > 0.05$ ). The *dhfr*-N51I-C59R-S108N-*dhps*-S436A mutants were the most common (66.7%). Polymorphism in the *K13* genes revealed nine synonymous mutations: A621A, A627A, D646D, G496G, G690G, Q707Q, and S425S. There were also four non-synonymous mutations: A578S, V589I, and V520I/V637I.

**Conclusion.** This study shows that *Plasmodium* parasites carrying both synonymous and non-synonymous mutations were detected, highlighting the need to regularly monitor these resistance markers.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, Universal access, Treatment, Artemether-lumefantrine, Artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine, Resistance markers, Genetic diversity, Central African Republic, Sub-Saharan Africa

## Introduction

Le paludisme, demeure une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 263 millions de cas, pour un total de 597 000 décès ont été rapportés en 2023 [20]. En République centrafricaine (RCA), la transmission du paludisme est de type pérenne et holoendémique. L'incidence globale du paludisme est de 40,6 cas pour 1 000 habitants dans la population générale et de 165,3 cas pour 1 000 enfants de moins de 5 ans [7,12]. La lutte contre le paludisme repose, entre autres, sur le diagnostic précoce et le traitement afin de prévenir l'émergence d'une résistance du parasite surtout aux dérivés de l'artémisinine (ACT), traitements de première intention, depuis l'émergence des cas de résistance à la chloroquine (40%), à l'amodiaquine (23 %) et à la sulfadoxine-pyriméthamine (22 %) [16,17,19]. Les ACT ont été introduits dans la prise en charge du paludisme simple en RCA depuis 2005. Selon les recommandations de l'OMS, une surveillance régulière de leur efficacité doit être mise en place à travers les tests d'efficacité thérapeutique dans tous les pays où ces molécules sont utilisées. L'objectif de cette étude était de surveiller l'efficacité des combinaisons arthémether-luméfantrine (AL) et artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP), utilisées dans le traitement du paludisme simple en RCA, d'une part par la surveillance clinique et parasitologique et d'autre part par l'analyse des marqueurs de résistance au niveau du gène *K13* selon les critères de (i) décroissance parasitaire, (ii) taux des réponses cliniques et parasitologiques adéquates selon les critères de l'OMS [22], (iii) évolution de la température corporelle et amélioration de l'anémie, (iv) polymorphisme génétique du gène *K13* dans les isolats de *Plasmodium falciparum*.

## Méthodologie

Cette étude transversale à visée comparative simple a été réalisée du 24 août au 27 novembre 2024 chez des enfants de 6 mois à 14 ans pris en charge pour accès palustre simple à l'hôpital général de Boali.

Critères d'inclusion : (i) patient âgé de 6 mois à 14 ans souffrant d'une infection mono spécifique à *P. falciparum* avec une parasitémie comprise entre 700 à 200 000 formes asexuées/ $\mu$ L de sang; (ii) température axillaire supérieure ou égale à 37,2°C; (iii) possibilité de suivi avec accès facile au centre de santé; (iv) consentement éclairé des parents.

## Introduction

Malaria remains one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. According to the World Health Organization (WHO), there were approximately 263 million reported cases in 2023, resulting in 597,000 deaths [20]. In the Central African Republic (CAR), malaria transmission is year-round and holoendemic. The overall incidence is 40.6 cases per 1,000 people in the general population and 165.3 cases per 1,000 children under five years of age [7,12]. The fight against malaria relies on early diagnosis and treatment to prevent the emergence of parasite resistance, particularly to artemisinin-based combination therapies (ACTs), the first-line treatment, since resistance has emerged to chloroquine (40%), amodiaquine (23%), and sulfadoxine-pyrimethamine (22%) [16,17,19]. ACTs have been used to manage uncomplicated malaria in CAR since 2005. According to WHO recommendations, all countries where these drugs are used must implement regular monitoring of their effectiveness through therapeutic effectiveness testing. This study aimed to monitor the effectiveness of artemether-lumefantrine (AL) and artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (ASSP) combinations used to treat uncomplicated malaria in the CAR. Monitoring was conducted through clinical and parasitological surveillance and analysis of resistance markers at the *K13* gene level based on the following criteria: (i) parasite decline; (ii) rates of adequate clinical and parasitological responses according to WHO criteria [22]; (iii) changes in body temperature and improvement in anemia; and (iv) genetic polymorphism of the *K13* gene in *Plasmodium falciparum* isolates.

## Methodology

This simple, cross-sectional, comparative study was conducted from August 24 to November 27, 2024. It was conducted among children aged six months to 14 years who were treated for uncomplicated malaria at Boali General Hospital.

Inclusion criteria: (i) Patients aged 6 months to 14 years with monospecific *P. falciparum* infection and parasitemia ranging from 700 to 200,000 asexual forms per  $\mu$ L of blood, (ii) an axillary temperature of at least 37.2°C, (iii) the ability to undergo follow-up with easy access to the health center, and (iv) informed consent from parents.

Critères de non-inclusion : (i) présence de signes généraux de danger chez les enfants ou de signes de paludisme à *P. falciparum* grave selon les définitions de l'OMS; (ii) poids corporel inférieur à 5 kg; (iii) taux d'hémoglobine < 8 g/dL; (iv) infestation mixte ou infestation monospécifique par une autre espèce de *Plasmodium*; (v) malnutrition grave; (vi) état fébrile dû à des maladies autres que le paludisme; (vii) antécédents d'hypersensibilité aux traitements administrés.

Critères d'exclusion : (i) patient perdu de vue; (ii) retrait de consentement éclairé; (iii) patient présentant des vomissements persistants; (iv) manifestations d'effets indésirables graves, nécessitant de mettre fin au traitement avant qu'il ne soit achevé; (v) développement d'un paludisme grave dans les 24 heures suivant le début du traitement. Deux associations médicamenteuses ont été utilisées, l'artémether-luméfamtrine (AL) et l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP) comme indiqué dans les Tableaux I et II.

La taille de chaque bras de l'étude (N) a été calculée en utilisant la formule  $N = Z^2 \cdot P(1-P) / E^2$ . La proportion d'échec anticipé dans la population (P) était de 15 %, le niveau de confiance (Z) de 95 %, la marge d'erreur (E) de 10 % par bras [21]. Le nombre minimum de patients nécessaire était alors de 88 par traitement.

Non-inclusion criteria: (i) the presence of general danger signs in children or signs of severe *P. falciparum* malaria, according to WHO definitions; (ii) body weight less than 5 kg; (iii) hemoglobin level less than 8 g/dL; (iv) mixed infection or monospecific infection with another *Plasmodium* species; (v) severe malnutrition; (vi) a febrile illness due to a condition other than malaria; and (vii) a history of hypersensitivity to the administered treatments.

Exclusion criteria: (i) patient lost to follow-up; (ii) withdrawal of informed consent; (iii) patient with persistent vomiting; (iv) manifestations of serious adverse effects requiring discontinuation of treatment before completion; and (v) development of severe malaria within 24 hours of treatment initiation.

Two drug combinations were used: artemether-lumefantrine (AL) and artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (ASSP), as shown in Tables I and II.

The sample size for each study arm (N) was calculated using the formula  $N = Z^2 \cdot P(1-P) / E^2$ . The expected failure rate in the population (P) was 15%, the confidence level (Z) was 95%, and the margin of error (E) was 10% per arm [21]. Therefore, the minimum number of patients required was 88 per treatment.

Tableau I : Posologie de l'artémether-luméfamtrine (AL)

Table I: Dosage of artemether-lumefantrine (AL)

| Poids / Weight               | Nombre de comprimés à chacune des 6 prises /<br>Number of tablets for each of the 6 doses |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 à < 15 kg / 5 to < 15 kg   | 1                                                                                         |
| 15 à < 25 kg / 15 to < 25 kg | 2                                                                                         |
| 25 à < 35 kg / 25 to < 35 kg | 3                                                                                         |
| ≥ 35 kg / ≥ 35 kg            | 4                                                                                         |

Nombre de comprimés à chaque prise: 20 mg d'artémether + 120 mg de luméfamtrine H0, H8, H24, H36, H48 et H6/  
Number of tablets per dose: 20 mg of artemether + 120 mg of lumefantrine H0, H8, H24, H36, H48, and H60

Tableau II : Posologie de l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP)

Table II: Dosage of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine (ASSP)

| Age / Age                               | Poids / Weight      | Artésunate (J1-J3) / Artesunate (D1-D3)     | SP (dose unique J1) /<br>SP (single dose D1) |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|
| < 1 an / < 1 year                       | 5-8 kg / 5-8 kg     | ½ cp (25 mg) x1/jour / ½ tab (25 mg) x1/day | ¼ cp / ¼ tab                                 |
| 1-5 ans / 1-5 years                     | 9-17 kg / 9-17 kg   | 1 cp (50 mg) x1/jour / 1 tab (50) x1/day    | ½ cp / ½ tab                                 |
| 6-9 ans / 6-9 years                     | 18-29 kg / 18-29 kg | 2 cp (100 mg) x1/jour / 2 tab (100) x1/day  | 1 cp / 1 tab                                 |
| 10-14 ans / 10-14 years                 | 30-39 kg / 30-39 kg | 3 cp (150 mg) x1/jour / 3 tab (150) x1/day  | 1,5 cp / 1.5 tab                             |
| ≥ 15 ans-adultes /<br>≥ 15 years-adults | ≥ 40 kg / ≥ 40 kg   | 4 cp (200 mg) x1/jour / 4 tab (200) x1/day  | 2 cp / 2 tab                                 |

Artésunate 50 mg + 500 mg de sulfadoxine + 25 mg de pyriméthamine Artesunate 50 mg + 500 mg sulfadoxine + 25 mg pyrimethamine

Un infirmier procédait à la prise du poids et de la température axillaire. La recherche des signes de gravité était réalisée par le clinicien. Un technicien effectuait une goutte épaisse (GE), un frottis mince et un dosage de l'hémoglobine (Hemocue HB 301 analyser, Kuvettgatan, Suède). Les enfants ayant un taux d'hémoglobine supérieur à 8 g/dl et une GE comprise entre 700 et 200 000 parasites/ $\mu$ L étaient inclus après accord du responsable.

Un numéro de code a été attribué à chaque patient à J0 de façon aléatoire en vue de rendre les dossiers anonymes. Un coefficient entre 0 et 1 a été généré sur fichier Excel 2013, pour répartir aléatoirement les patients dans 2 différents groupes de traitements. La première dose du traitement a été administrée au Centre de santé par le personnel soignant, et les patients ont été observés pendant 30 minutes avant de quitter le site. En cas de vomissements, la même dose était répétée. Les doses suivantes étaient administrées à domicile par les responsables en charge de l'enfant. L'adhésion au traitement était vérifiée par le personnel soignant le 3<sup>e</sup> jour sur présentation du reste de la plaquette et description de l'administration du traitement. Afin d'apprécier les clairances parasitaire et thermique, une GE et une prise de la température étaient réalisées à J3, J7, J14, J21 et J28.

Les critères d'évaluation des réponses étaient ceux définis par l'OMS [21]. Les réponses au traitement ont été classées en réponse clinique parasitologique adéquate (RCPA), échec thérapeutique précoce (ETP), en échec clinique tardif (ECT) et échec parasitologique tardif (EPT) comme suit: (i) ETP, de J0 à J3, signe de danger ou d'accès palustre à J1, J2 ou J3; fièvre + parasitémie augmentée à J2 ou fièvre + parasitémie à J3; ou parasitémie à J3 supérieure ou égale à 25% de la parasitémie à J0, (ii) EPT, de J7 à J14 ou J28, présence des parasites sans fièvre, (iii) ECT, de J4 à J14 ou J28, signes de dangers ou d'accès palustre après J3; fièvre + parasitémie positive entre J4 et J28, (iv) RCPA, absence de parasites détectables entre J2 et J28, et absence de fièvre entre J2 et J28.

Les observations microscopiques étaient faites par deux microscopistes en double lecture. Les densités parasitaires étaient exprimées selon la formule: nombre de parasites asexués  $\times$  8 000 / nombre de globules blancs par  $\mu$ L de sang sur 200 champs de leucocytes. Une lame sur 3 a fait l'objet d'une 2<sup>e</sup> lecture par un troisième microscopiste accrédité par l'Institut Pasteur de Bangui pour le contrôle qualité, sans qu'aucune discordance n'ait été constatée.

A nurse measured weight and axillary temperature. The clinician assessed signs of severity. A technician performed a thick smear, a thin smear, and a hemoglobin measurement using a Hemocue HB 301 analyzer (Kuvettgatan, Sweden). After approval by the principal investigator, children with a hemoglobin level greater than 8 g/dL and a thick smear count between 700 and 200,000 parasites/ $\mu$ L were included.

On D0, a code number was randomly assigned to each patient to anonymize the records. In Excel 2013, a coefficient between 0 and 1 was generated to randomly assign patients to two different treatment groups. Healthcare staff administered the first dose of treatment at the health center, and patients were observed for 30 minutes before leaving the site. If a patient vomited, the same dose was repeated. Subsequent doses were administered at home by the caregivers responsible for the child. Healthcare staff verified adherence to treatment on the third day by having patients present the remaining blister pack and describe how the treatment was administered.

To assess parasite clearance and fever resolution, stool examinations and temperature measurements were performed on D3, D7, D14, D21, and D28.

The WHO [21] defined the criteria for evaluating treatment responses. Treatment responses were classified in adequate clinical and parasitological response (ACPR), early treatment failure (ETF), late clinical failure (LCF), late parasitological failure (LPF), as follows: (i) ETF, from D0 to D3: signs of danger or malaria symptoms on D1, D2, or D3; fever plus increased parasitemia on D2; fever plus parasitemia on D3; or parasitemia on D3 equal to or greater than 25% of D0 parasitemia, (ii) LPF, from D0 to D7, 14, or D28: presence of parasites without fever, (iii) LCF, from D0 to D4, D14, or D28: signs of danger or malaria symptoms after D3; fever plus positive parasitemia between D4 and D28, and (iv) ACPR: absence of detectable parasites between D2 and D28 and absence of fever between D2 and D28.

Two microscopists performed dual microscopic readings. Parasite densities were calculated using the following formula: number of asexual parasites  $\times$  8,000 / number of white blood cells per  $\mu$ L of blood across 200 leukocyte fields. One out of every three slides was reviewed a second time by a third microscopist, accredited by the Pasteur Institute of Bangui, for quality control; no discrepancies were observed.

Pour les analyses moléculaires, cinq spots de sang ont été réalisés sur papier filtre Whatman. Parmi les 199 échantillons collectés pour la réalisation de la PCR espèce pour valider la présence de *P. falciparum* puis séquençage des gènes *K13*, *dhps* et *dhfr*, 73 étaient négatifs soit 36,7% et 126 étaient positifs soit 63,3%. Pour le séquençage, les 126 échantillons ont donné des résultats exploitables pour le gène *K13*, 123 pour *dhfr* et 114 sont exploitables pour *dhps*.

L'ADN parasite a été extrait par QIAGEN (QIAamp DNA Blood Minikit) [1]. La PCR en temps réel à l'aide de SYBR et d'amorces spécifiques pour le gène cytochrome B de *P. falciparum* a été réalisée pour confirmer l'espèce plasmodiale infectante à J0 [22]. Les réactifs commercialisés dans le kit SYBR Green Master Mix I (Roche Diagnostics) comprennent deux mélanges 1a et 1b contenant l'intercalant fluorescent SYBR green, les dNTP, la Taq polymérase et le  $\text{mgCl}_2$ . Les réactions ont lieu dans le thermocycleur Lightcycler et sous un volume final de 20  $\mu\text{l}$  dont 5  $\mu\text{l}$  d'ADN extrait à amplifier. Un couple d'amorces spécifiques de *P. falciparum*: PanPalu 5'-AGTGTGTATCAATCGAGTTTC-3' et PfaIR 5'-AGTTCCCCTAGAATAGTTACA-3' était utilisé. Les échantillons positifs ont été sélectionnés pour l'analyse des marqueurs de résistance à l'artémisinine (*K13*), à la pyriméthamine (*dhfr*) et à la sulfadoxine (*dhps*) avec les amorces spécifiques présentées dans le tableau III [23-25].

Les régions qui codaient pour ces gènes étaient amplifiées et séquencées par *amplicon sequencing* à l'Institut Pasteur de Madagascar [23-25].

Le programme d'amplification par PCR avec le *sybr green* en temps réel est consigné dans le tableau IV.

Les moyennes sont indiquées avec des intervalles de confiance à 95% et les valeurs extrêmes de la distribution.

Les tests statistiques utilisés pour comparer moyennes et proportions utilisaient le seuil de  $p < 0,05$ . Afin d'établir un lien entre les marqueurs de résistance et les paramètres cliniques et biologiques, le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé avec  $r_s > 0$  considéré comme corrélation positive.

For molecular analyses, five blood spots were prepared on Whatman filter paper. Of the 199 samples collected for species-specific PCR to confirm the presence of *P. falciparum*, followed by sequencing of the *K13*, *dhps*, and *dhfr* genes, 73 were negative (36.7%) and 126 were positive (63.3%). The 126 positive samples yielded usable sequencing results for the *K13* gene in 123 samples, the *dhfr* gene in 114 samples, and the *dhps* gene in 114 samples.

Parasite DNA was extracted using the QIAGEN QIAamp DNA Blood Minikit [1]. Real-time PCR using SYBR Green and primers specific for the cytochrome B gene of *P. falciparum* was performed to confirm the infecting *Plasmodium* species at D0 [22]. The reagents supplied in the SYBR Green Master Mix I kit (Roche Diagnostics) include two mixtures, 1a and 1b, containing the fluorescent intercalator SYBR Green, dNTPs, Taq polymerase, and  $\text{mgCl}_2$ . Reactions were performed in a LightCycler thermocycler at a final volume of 20  $\mu\text{l}$ , including 5  $\mu\text{l}$  of extracted DNA to be amplified. A pair of primers specific to *P. falciparum*—PanPalu 5'-AGTGTGTATCAATCGAGTTTC-3' and PfaIR 5'-AGTTCCCCTAGAATAGTTACA-3'—was used. Positive samples were selected for analysis of resistance markers for artemisinin (*K13*), pyrimethamine (*dhfr*), and sulfadoxine (*dhps*) using the specific primers presented in Table III [23–25]. The regions encoding these genes were amplified and sequenced by amplicon sequencing at the Pasteur Institute of Madagascar [23–25].

The PCR amplification protocol using real-time SYBR Green is presented in Table IV.

Means are reported with 95% confidence intervals and the extreme values of the distribution.

Statistical tests used to compare means and proportions employed a p-value threshold of  $p < 0.05$ . To establish a relationship between resistance markers and clinical and biological parameters, Pearson's correlation coefficient was used, with  $r_s > 0$  considered a positive correlation.

Surveillance de l'efficacité des associations artémether-luméfantrine et artésunate/sulfadoxine-pyriméthamine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* à Boali, République centrafricaine  
Monitoring the efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-sulfadoxine/pyrimethamine combinations for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Boali, Central African Republic

Tableau III : Séquences des amorces spécifiques pour les gènes de résistance étudiés

Table III: Sequences of specific primers for the resistance genes studied

|   | Gène <i>K13</i> (5'----3') /<br><i>K13</i> gene (5'----3') | Gène <i>dhfr</i> (5'---3')/<br><i>dhfr</i> gene (5'----3') | Gène <i>dhps</i> (5'---3')/<br><i>dhps</i> gene (5'----3') |
|---|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| F | GCCAAGCTGCCATTCATTTG                                       | TTTATATTTTCTCCTTTT                                         | CCATTCCTCATGTGTATACAACAC                                   |
| R | GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA                                       | CATTTTATTATTCGTTTTCT                                       | CTTGGTCTATTTTGTAAAACATCC                                   |

F: amorces sens ; R: amorces anti sens / F: sense primers; R: antisense primers

Tableau IV : Programme de PCR en temps réel pour l'amplification de gène cytochrome B de *Plasmodium falciparum*

Table IV: Real-time PCR program for amplification of the cytochrome B gene of *Plasmodium falciparum*

|                                                                                     | Étapes / Steps                                     | Temps et températures /<br>Time and temperature     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                                                                     | Dénaturation initiale /<br>Initial denaturation    | 8 minutes à 95 °C / 8 minutes at 95°C               |
| Cycles d'amplifications répétés 40 fois /<br>Amplification cycles repeated 40 times | Dénaturation / Denaturation                        | 10 secondes à 95 °C / 10 seconds at 95°C            |
|                                                                                     | Hybridation des amorces /<br>Primer hybridization  | 10 secondes à 58 °C / 10 seconds at 58°C            |
|                                                                                     | Élongation / Melting                               | 30 secondes à 72 °C / 30 seconds at 95°C            |
| Courbes de fusions / Melting curves                                                 | Dénaturation / Denaturation                        | 2 secondes à 95 °C / 2 seconds at 95°C              |
|                                                                                     | Hybridation / Extension                            | 20 secondes à 50 °C / 20 seconds at 50°C            |
|                                                                                     | Dénaturation progressive /<br>Gradual denaturation | 0,2°C/seconde jusqu'à 95 °C /<br>0.2 second at 95°C |
|                                                                                     | Refroidissement / Cooling                          | 30 secondes à 95 °C / 30 seconds at 95°C            |

## Résultats

Au total, 199 patients ont été inclus dont 101 pour AL et 98 pour ASSP. La moyenne d'âge était de  $3,76 \pm 1,58$  ans avec des extrêmes de 6 mois à 14 ans pour AL et de  $4,37 \pm 0,58$  ans avec des extrêmes de 6 mois à 13 ans pour ASSP sans différence significative entre les deux groupes ( $p=0,73$ ). Le sex-ratio était de 1,29. La température moyenne initiale était de  $37,74 \pm 1,02$  °C pour AL avec des extrêmes de  $37,9$  °C à  $39,6$  °C et de  $37,75 \pm 0,9$  °C pour ASSP avec des extrêmes de  $37,6$  °C à  $39,6$  °C. La parasitémie moyenne était de  $4\,216,39 \pm 6\,700$  parasites/ $\mu$ L pour AL avec des extrêmes de 740 à 58 960 parasites/ml et  $2\,567,98$  parasites/ml pour ASSP avec des extrêmes de 720 à 68 940 sans différence significative entre les deux groupes ( $p=0,64$ ). Le taux moyen de l'hémoglobine était de  $11,58 \pm 0,78$  g/dl pour AL et  $11,59 \pm 0,88$  g/dl pour ASSP ( $p=0,9$ ) (Tableau V). A J3, 97 patients (96 %) avaient une parasitémie négative pour AL et 94 patients (95,9 %) avaient une parasitémie négative pour ASSP. La situation était restée stable à J7, J14, J21 et J28 (Fig. 1).

A J3, 100 % des patients avaient une température normale pour AL et ASSP et la situation était restée stable à J7, J14, J21 et J28.

## Results

A total of 199 patients were included in the study, comprising 101 with AL and 98 with ASSP. The mean age was  $3.76 \pm 1.58$  years for AL and  $4.37 \pm 0.58$  years for ASSP. Ages ranged from six months to 14 years for AL and six months to 13 years for ASSP. There was no significant difference between the two groups ( $p=0.73$ ). The sex ratio was 1.29. The mean initial temperature was  $37.74 \pm 1.02$  °C for AL, ranging from  $37.9$  °C to  $39.6$  °C, and  $37.75 \pm 0.9$  °C for ASSP, ranging from  $37.6$  °C to  $39.6$  °C. The mean parasitemia was  $4,216.39 \pm 6,700$  parasites/ $\mu$ L for AL, ranging from 740 to 58,960 parasites/ $\mu$ L, and  $2,567.98$  parasites/ $\mu$ L for ASSP, ranging from 720 to 68,940. There was no significant difference between the two groups ( $p=0.64$ ). The mean hemoglobin level was  $11.58 \pm 0.78$  g/dL for AL and  $11.59 \pm 0.88$  g/dL for ASSP ( $p=0.9$ ) (Table V).

On D3, 97 patients (96%) in the AL group and 94 patients (95.9%) in the ASSP group had negative parasitemia. This remained stable on D7, D14, D21, and D28 (Fig. 1).

One hundred percent of patients had normal temperatures on D3 for both AL and ASSP, and this remained stable on D7, D14, D21, and D28.

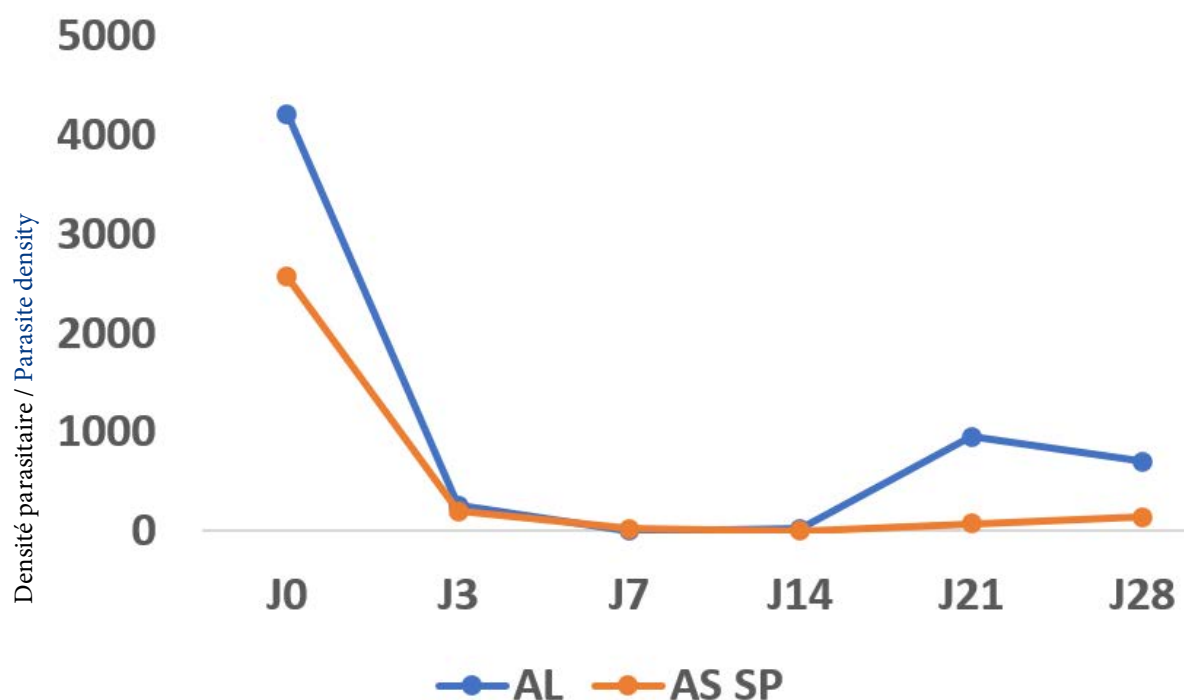
Surveillance de l'efficacité des associations artémether-luméfantrine et artésunate/sulfadoxine-pyriméthamine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* à Boali, République centrafricaine  
Monitoring the efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-sulfadoxine/pyrimethamine combinations for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Boali, Central African Republic

**Tableau V : Caractéristiques sociodémographiques et biologiques de la population d'étude à l'inclusion**  
**Table V: Sociodemographic and biological characteristics of the study population at inclusion**

| Caractéristiques / Characteristics                    |                   | AL N = 101 (%) /<br>AL N = 101 (%)       | ASSP N = 98 (%) /<br>ASSP N = 98 (%)     | Total N = 199 /<br>Total N = 199 | p / p |
|-------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|-------|
| Sexe / Gender                                         | Masculin / Male   | 54 (53,5)                                | 58 (59,6)                                | 112 (56,3)                       | 0,25  |
|                                                       | Féminin / Female  | 47 (46,5)                                | 40 (40,8)                                | 87 (43,7)                        |       |
| Âge (an) / Age (years)                                | Moyenne / Average | 3,76±1,58                                | 4,37±0,58                                | 199                              | 0,73  |
|                                                       | Extrême / Extreme | 6 mois – 14 ans /<br>6 months - 14 years | 6 mois – 13 ans /<br>6 months - 13 years |                                  |       |
| Parasitémie /µl de sang /<br>Parasitemia /µl of blood | Moyenne / Average | 4 216,39 ± 6 700                         | 2 567,98 ± 4 300                         | 3 404, 61                        | 0,53  |
|                                                       | Extrême / Extreme | 740 – 58 960                             | 720 – 68 940                             |                                  |       |
| Hémoglobine (g/dl) /<br>Hemoglobin (g/dl)             | Moyenne / Average | 11,58±0,78                               | 11,59±0,88                               | 11,58                            | 0,90  |
| Température /<br>Temperature                          | Moyenne / Average | 37,74 ± 1,02                             | 37,75 ± 0,9                              | 37,74                            | 0,64  |
|                                                       | Extrême / Extreme | 37,90-39,60                              | 37,60-39,60                              |                                  |       |

AL: artémether-luméfantrine, ASSP: artésunate-sulfaméthoxypyrazine-pyriméthamine

AL: artemether-lumefantrine, ASSP: artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine



**Figure 1 : Décroissance parasitaire au cours du suivi selon le traitement de J0 à J28**

**Figure 1: Parasitic decay to treatments from D0 to D28**

À J3, le taux de guérison était de 98,8 % pour AL et ASSP. À J28, le nombre total de patients *per protocole* était encore de 159. Les perdus de vue étaient au nombre de 19 pour AL et 21 pour ASSP sans différence significative entre les 2 groupes ( $p > 0,05$ ). Aucun patient n'a été exclu de l'étude pour cause de manifestations d'effets indésirables graves, nécessitant de mettre fin au traitement avant qu'il ne soit achevé. Nous avons observé avec AL: un cas d'ETF (1,2 %), trois cas d'ECT (3,7 %) et 11 cas d'EPT (13,4 %). Avec ASSP, nous avons relevé deux cas d'ETF (2,7 %) et 12 cas d'EPT (15,6 %). Par ailleurs, nous avons observé 130 cas de RCPA cumulés (81,8 %) [IC95%: 63,8-72,2] dont 67 cas pour AL (81,8 %) et 63 cas pour ASSP (81,9 %) sans différence statistiquement significative entre les deux groupes ( $p > 0,05$ ) (Tableau VI).

The cure rate was 98.8% for both AL and ASSP on D3. On D28, the total number of patients per protocol remained at 159. There were 19 patients lost to follow-up in the AL group and 21 in the ASSP group, with no significant difference between the two groups ( $p > 0.05$ ). No patients were excluded from the study due to serious adverse events requiring discontinuation of treatment before completion. With AL, we observed one case of ETF (1.2%), three cases of LCF (3.7%), and 11 cases of LPF (13.4%). With ASSP, we recorded two cases of ETF (2.7%) and 12 cases of LPF (15.6%). Additionally, we observed a cumulative total of 130 RCPA cases (81.8%) [95% CI: 63.8–72.2], including 67 AL cases (81.8%) and 63 ASSP cases (81.9%), with no significant difference between the groups ( $p > 0.05$ ) (Table VI).

Tableau VI: Réponses cliniques et biologiques aux traitements par artémether-luméfantrine (AL) et artésunate / sulfadoxine-pyriméthamine (ASSP)

Table VI: Clinical and biological responses to artemether-lumefantrine (AL) and artesunate/sulfadoxine-pyrimethamine (ASSP)

| Paramètres de suivi J3 à J28 / AL N=82 (%)  | AL N=82 (%) / AL N=82 (%) | ASSP N=77 (%) / ASSP N=77 (%) | p / p |
|---------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------|
| Taux de guérison à J3 / Recovery rate on D3 | 82 (100)                  | 75 (97,40)                    | 0,19  |
| ETF / ETF                                   | 1 (1,22)                  | 2 (2,60)                      | 0,39  |
| ECT / LCF                                   | 3 (3,67)                  | 0 (0,00)                      | 0,23  |
| EPT / LPF                                   | 11 (13,41)                | 12 (15,58)                    | 0,85  |
| RCPA / ACPR                                 | 67 (81,70)                | 63 (81,82)                    | 0,20  |
| Total per protocole / Total per protocol    | 82 (100)                  | 77 (100)                      |       |

Parmi les 199 échantillons analysés, 63,31% soit 126/199 échantillons ont donné des résultats exploitables pour le séquençage des gènes *K13*, 61,8% soit 123/199 pour le gène *dhfr* et 57,28% soit 114/199 pour le gène *dhps*.

Pour le gène *K13*, l'allèle sauvage a été détecté dans 111 échantillons soit 87,40%. Neuf mutations synonymes ont été trouvées à savoir: A621A, A627A, D646D, G496G, G690G, Q707Q, S425S, T535T, V510V avec une prévalence variant entre 0,8 et 1,6 %. Quatre mutations non synonymes ont été détectées à savoir: A578S (1,6 %), V589I (0,8 %) ainsi que V520I associé à V637I dans deux échantillons (1,6 %). Aucune mutation considérée comme associée à la baisse de l'efficacité de l'artémisinine n'a été observée au cours de cette étude (Fig. 2). Le mutant non synonyme V589I sur le gène *K13* a été associé à un retard de clairance parasitaire ( $rs = 0,18$ ).

L'analyse du gène *dhfr* a montré que tous les échantillons analysés comportaient des mutations. Le triple mutant N51I-C59R-S108N a été détecté

Of the 199 samples analyzed, 63.31% (126 samples) yielded usable results for *K13* gene sequencing, 61.8% (123 samples) for the *dhfr* gene, and 57.28% (114 samples) for the *dhps* gene.

The wild-type allele was detected in 111 samples (87.40%) for the *K13* gene. Nine synonymous mutations were identified: A621A, A627A, D646D, G496G, G690G, Q707Q, S425S, T535T, and V510V. These mutations had a prevalence ranging from 0.8% to 1.6%. Four non-synonymous mutations were detected: A578S (1.6%), V589I (0.8%), and V520I, which was associated with V637I in two samples (1.6%). No mutations associated with reduced artemisinin efficacy were observed during this study (Fig. 2). The non-synonymous mutation V589I in the *K13* gene was associated with delayed parasite clearance ( $rs = 0.18$ ).

Analysis of the *dhfr* gene showed that all analyzed samples contained mutations. The triple mutant N51I-C59R-S108N was present in 95.1% of cases;

dans 95,1 % des cas, le double mutant C59R-S108N dans 3,2 % et le double mutant N51I-S108N dans 1,7 % des cas (Fig. 3).

Le gène *dhps* présentait des allèles sauvages dans 28 isolats, soit 24,6 % des cas. Le mutant S436A a été retrouvé dans 79 isolats soit 69,3 % des cas et les allèles mutants I431V-S436A, S436A-A581G et S436A-A613S dans 1,8 %, 0,9 % et 0,9 % des cas respectivement. Les mutants I431V-S436A-A581G-A613S ont été retrouvés dans 2,7 % des cas (Fig. 4). Par ailleurs, des mutations sur les gènes *dhfr* et *dhps* au sein d'un même échantillon ont été détectées 86 fois (75,4 %). Le mutant *dhfr*-N51I-C59R-S108N-*dhps*-S436A était majoritaire (66,6 % des cas). La mutation sur le codon 540 qui détermine la résistance à la sulfadoxine n'a pas été retrouvée au cours de cette étude.

the double mutant C59R-S108N was present in 3.2% of cases; and the double mutant N51I-S108N was present in 1.7% of cases (Fig. 3).

Wild-type alleles were exhibited by the *dhps* gene in 28 isolates, representing 24.6% of cases. The S436A mutant was found in 79 isolates (69.3% of cases), and the I431V-S436A, S436A-A581G, and S436A-A613S mutant alleles were found in 1.8%, 0.9%, and 0.9% of cases, respectively (Fig. 4). The I431V-S436A-A581G-A613S mutant was found in 2.7% of cases (Fig. 5). Additionally, mutations in both the *dhfr* and *dhps* genes within the same sample were detected 86 times (75.4%). The *dhfr*-N51I-C59R-S108N-*dhps*-S436A mutant was the most common, accounting for 66.6% of cases. The mutation at codon 540, which confers resistance to sulfadoxine, was not detected during this study.

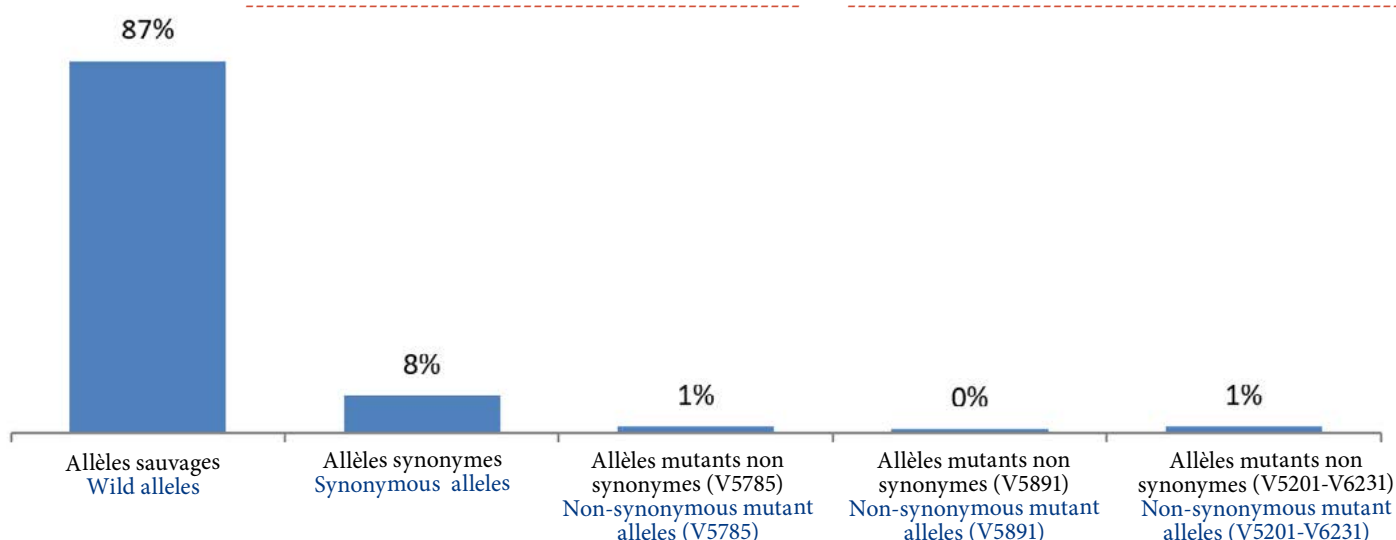


Figure 2 : Proportions des allèles sauvages et mutants du gène *Kelch13* propeller

Figure 2: Proportions of wild and mutant alleles of the *Kelch13* propeller gene

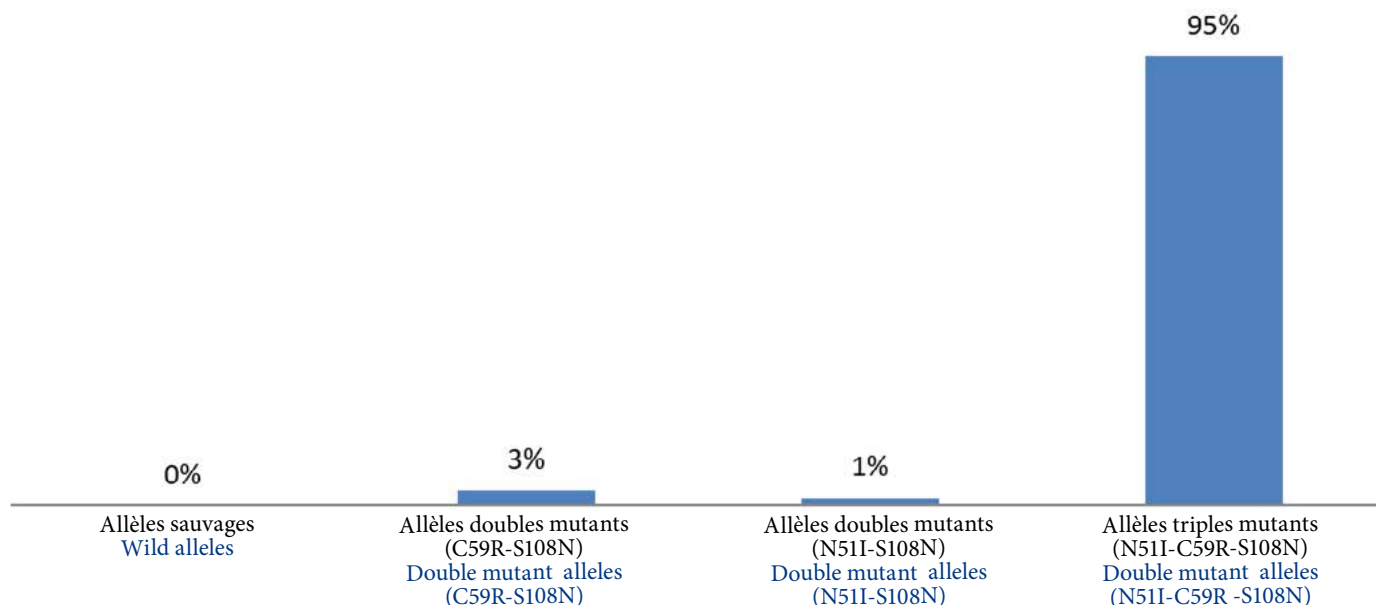
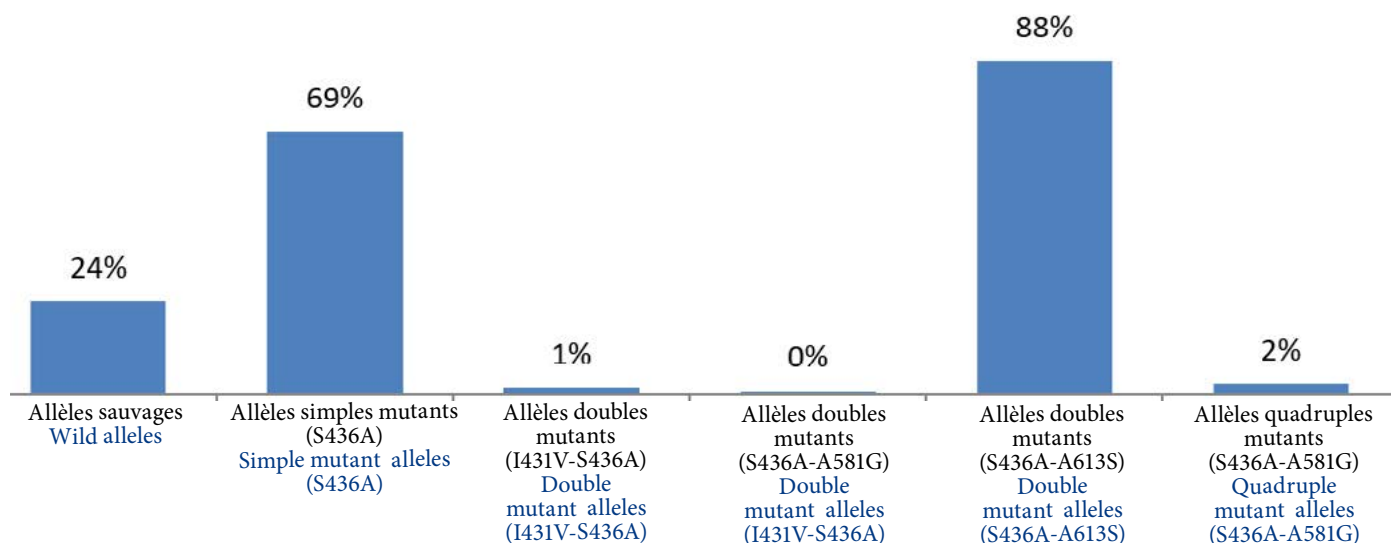


Figure 3 : Proportions des allèles sauvages et mutants du gène *dhfr* résistant à la Pyriméthamine

Figure 3: Proportions of wild and mutant alleles of the *dhfr* gene resistant to pyrimethamine

Figure 4 : Proportions des allèles sauvages et mutants du gène *dhps* résistant à la sulfadoxineFigure 3: Proportion of wild and mutant alleles of the *dhps* gene resistant to sulfadoxine

## Discussion

La surveillance régulière des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine constitue un outil nécessaire pour prévenir l'émergence et la propagation de la résistance aux antipaludéens. Ainsi, notre travail à Boali montre que la réduction attendue, rapide et nette de la parasitémie après trois jours de traitement par AL et ASSP à plus de 95 % dans les deux groupes de traitement sans différence significative entre les deux groupes ( $p > 0,05$ ) était encore obtenue. Il en était de même pour la fièvre et l'anémie. Par ailleurs, l'analyse du polymorphisme génétique au niveau du gène *K13* a montré que la majorité des isolats contenait des allèles de type sauvage (87,4 %) et qu'aucune mutation considérée comme associée à la résistance aux dérivés de l'artémisinine n'a été observée. Ces résultats confortent l'utilisation de ces deux combinaisons comme traitement de première intention dans cette région du pays. Toutefois, le suivi long des patients dans notre contexte constitue une limite dans la mesure où on note un nombre élevé de perdu de vue (PDV) dans les deux groupes. Ce qui réduit la taille de l'échantillon nécessaire pour une analyse approfondie et constitue un biais majeur dans la représentativité et la sélection des patients. Néanmoins, le calcul de la taille de l'échantillon prenant en compte par anticipation un risque de 10% de PDV est un atout pour la validité de ce travail. De même, le suivi à J28 peut sous-estimer les échecs tardifs, en particulier pour les molécules à demi-vie prolongée. Nos résultats corroborent ceux rapportés antérieurement et réalisés dans différents pays endémiques [2-6,8-11,13-19]. Ces

## Discussion

Regularly monitoring artemisinin-based combination therapies is necessary to prevent the emergence and spread of resistance to antimalarial drugs. Our study in Boali shows that the expected rapid and significant reduction in parasitemia by more than 95% after three days of treatment with AL and ASSP was achieved in both treatment groups, with no significant difference between the two groups ( $p > 0.05$ ). The same was true for fever and anemia. Furthermore, analysis of genetic polymorphism in the *K13* gene revealed that most isolates contained wild-type alleles (87.40%), and no mutations associated with artemisinin resistance were observed. These results support the use of these two combinations as first-line treatments in this region. However, a limitation of our study is the high number of patients lost to follow-up (LTFU) in both groups. This reduces the sample size required for an in-depth analysis and constitutes a major source of bias in the representativeness and selection of patients. Nevertheless, the sample size calculation, which anticipated a 10% risk of LTFU, strengthens the validity of this study. Similarly, follow-up on D28 may underestimate late treatment failures, particularly for drugs with a prolonged half-life. Our results corroborate those previously reported from various endemic countries [2-6,8-11,13-19]. These findings support the continued use of artemisinin-based combination treatments.

Of all the non-synonymous mutations, only the V589I mutation was associated with slower parasite clearance in patients receiving AL and ASSP treatment ( $r = 0.18$ ). This differs from some studies

résultats plaident en faveur de la poursuite de l'utilisation des combinaisons à base des dérivés de l'artémisinine.

De toutes les mutations non synonymes, seule la mutation V589I était considérée comme associée au fait que certains patients éliminent moins vite les parasites sous traitement AL et ASSP (rs = 0,18). Ce qui diffère de certains travaux en Afrique [2,4]. Cette différence pourrait s'expliquer par des approches méthodologiques différentes. La mutation non synonyme A578S rapportée au cours de ces travaux a également été observée au Mali avec la même proportion de 1,5 % [2]. Ces mutations ne font pas partie des marqueurs de résistance validés ou candidats associés à la résistance signalés par l'OMS [8,21]. Ces mutations traduisent la diversité génétique du gène *K13* et ont été rapportées au Niger [5], au Kenya [6], en Guinée, en RDC [15] et au Sénégal [10]. Cependant, les cas d'échecs observés avec ASSP sont dus à des mutations observées au niveau des codons 51, 59 et 108 du gène *dhfr*, et des codons 431, 436 et 581 du gène *dhps*. Ces mêmes résultats ont été rapportés dans des travaux antérieurs [14]. L'absence de mutation sur le codon 540 plaide en faveur de l'efficacité de la sulfadoxine et donc de l'association ASSP.

## Conclusion

L'étude confirme l'efficacité clinique et biologique des ACT chez les enfants à Boali en 2024. L'analyse du gène *K13* a majoritairement mis en évidence les allèles de type sauvage. Les mutations synonymes et non synonymes observées traduisent la diversité génétique du gène *K13* et ne sont pas associées à la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Il serait judicieux de continuer à surveiller régulièrement l'efficacité des dérivés de l'artémisinine en vue de réduire la transmission de la maladie et prévenir l'émergence de la résistance.

## Remerciements

Nous remercions les participants pour leur coopération au cours de cette étude ainsi que le personnel de l'hôpital secondaire de Boali pour leurs appuis à la réussite de nos travaux.

conducted in Africa [2,4]. This discrepancy may be due to different methodological approaches. The A578S non-synonymous mutation, which was observed at a rate of 1.5% in Mali [2], was also reported in this study. However, these mutations are not among the validated or candidate resistance markers reported by the WHO [8,21]. These mutations reflect the genetic diversity of the *K13* gene and have been reported in Niger [5], Kenya [6], Guinea, the Democratic Republic of the Congo [15], and Senegal [10]. However, treatment failures with ASSP are due to mutations at codons 51, 59, and 108 of the *dhfr* gene and at codons 431, 436, and 581 of the *dhps* gene. These findings have been reported in previous studies [14]. The absence of a mutation at codon 540 supports the efficacy of sulfadoxine and, consequently, the efficacy of the ASSP combination.

## Conclusion

The study confirms the clinical and biological efficacy of ACTs in children in Boali in 2024. Analysis of the *K13* gene predominantly revealed wild-type alleles. The synonymous and non-synonymous mutations observed reflect the genetic diversity of the *K13* gene and are not associated with resistance to artemisinin-based drugs. To reduce disease transmission and prevent the emergence of resistance, it would be prudent to regularly monitor the efficacy of artemisinin-based drugs.

## Acknowledgments

We thank the participants for their cooperation during the study and the Boali Secondary Hospital staff for their support in ensuring the study's success.

## Financement

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier et technique du Fonds Mondial et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

## Funding

This work was carried out with financial and technical support from the Global Fund and the World Health Organization (WHO).

## Contribution des auteurs et autrices

DRA : collecte des données et analyse de laboratoire  
NMHB : lecture et correction du manuscrit  
NBR : analyse des données  
SP : collecte des données  
MZ : collecte des données  
JDL : lecture et corrections du manuscrit  
WSN : conception, élaboration, analyse des données, validation des résultats, rédaction et soumission du manuscrit

## Authors' contributions

DRA: data collection and laboratory analysis  
NMHB: review and revision of the manuscript  
NBR: data analysis  
SP: data collection  
MZ: data collection  
JDL: review and revision of the manuscript  
WSN: design, development, data analysis, validation of results, drafting, and submission of the manuscript

## Déclaration de liens d'intérêt

Aucun lien d'intérêt n'a été déclaré.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Auteurs / Authors

André DIAMAN-RONSONE (1, [dronsoneandr@yahoo.fr](mailto:dronsoneandr@yahoo.fr)), Hilary Bienvenue NAMBEI-MBOIFIO (5, [nambeihilary@gmail.com](mailto:nambeihilary@gmail.com)), Romaric NZOUMBOU-BOKO (2, [nzoumbou2@yahoo.fr](mailto:nzoumbou2@yahoo.fr)), Simon POUNGUINZA (3, [poungsims@gmail.com](mailto:poungsims@gmail.com)), Martin ZÉKANA (4, [martinezkana5@gmail.com](mailto:martinezkana5@gmail.com)), Jean de Dieu LONGO (1, [jeandiedieulongo@gmail.com](mailto:jeandiedieulongo@gmail.com)), Wilfrid Sylvain NAMBEI\* (1)  
1. Département de sciences biomédicales, Faculté des sciences de la santé, Université de Bangui, République centrafricaine  
2. Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur de Bangui, République centrafricaine  
3. Laboratoire National de biologie clinique et de santé publique de Bangui, République centrafricaine  
4. Hôpital secondaire de Boali, République centrafricaine  
5. Faculté de Médecine, Pharmacie Odontostomatologie, UCAD, Dakar, Sénégal  
Auteur correspondant : [wilfrid.nambei@gmail.com](mailto:wilfrid.nambei@gmail.com)

## Références / References

- Connon CC. Manual Silica-Based DNA Extractions. *Methods Mol Biol*. 2023;2685:35-51. doi: 10.1007/978-1-0716-3295-6\_3.
- Kakolwa MA, Mahende MK, Ishengoma DS, Mandara CI, Ngasala B, Kamugisha E, Kataraihya JB, Mandike R, Mkude S, Chacky F, Njau R, Premji Z, Lemnge MM, Warsame M, Menard D, Kabanywany AM. Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy, and molecular markers for artemisinin and piperazine resistance in Mainland Tanzania. *Malar J*. 2018 Oct 17;17(1):369. doi: 10.1186/s12936-018-2524-x.
- Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, Mumba D, Kekre M, Yavo W, Mead D, Bouyou-Akotet M, Apinjoh T, Golassa L, Randrianarivelojosia M, Andagalu B, Maiga-Ascofare O, Amambua-Ngwa A, Tindana P, Ghansah A, MacInnis B, Kwiatkowski D, Djimde AA. *K13*-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*. 2015 Apr 15;211(8):1352-5. doi: 10.1093/infdis/jiu608.
- Koumassadouno JF, Diallo MS, Agbodjato NA, Barry MS, Balde MC. Circulation des espèces plasmodiales dans les populations de la Guinée forestière. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2025;18(5):1781-9. doi: 10.4314/ijbcs.v18i5.13

- Laminou IM, Issa I, Adehossi E, Maman K, Jackou H, Coulibaly E, Tohon ZB, Ahmed J, Sanoussi E, Koko D. Therapeutic efficacy and tolerability of artemether-lumefantrine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Niger, 2020. *Malar J*. 2024 May 13;23(1):144. doi: 10.1186/s12936-024-04945-8.
- de Laurent ZR, Chebon LJ, Ingasia LA, Akala HM, Andagalu B, Ochola-Oyier LI, Kamau E. Polymorphisms in the *K13* Gene in *Plasmodium falciparum* from Different Malaria Transmission Areas of Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 May;98(5):1360-1366. doi: 10.4269/ajtmh.17-0505.
- Le Hesran JY. Les particularités du paludisme chez l'enfant. *Med Trop (Mars)*. 2000;60(1):92-8.
- Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JS, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, Musset L. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* *k13* C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife*. 2020 May 12;9:e51015. doi: 10.7554/eLife.51015.
- Mbacham HF, Mosume DM, Apinjoh TO, Ntui VN, Moyeh MN, Kalaji LN, Wepnje GB, Ghogomu SM, Dionne JA, Tita ATN, Achidi EA, Anchang-Kimbi JK. Sub-microscopic *Plasmodium falciparum* parasitaemia, dihydropteroate synthase (*dhps*) resistance mutations to sulfadoxine-pyrimethamine, transmission intensity and risk of malaria infection in pregnancy in Mount Cameroon Region. *Malar J*. 2023 Mar 2;22(1):73. doi: 10.1186/s12936-023-04485-7.
- Mbaye A, Dieye B, Ndiaye YD, Bei AK, Muna A, Deme AB, Yade MS, Diongue K, Gaye A, Ndiaye IM, Ndiaye T, Sy M, Diallo MA, Badiane AS, Ndiaye M, Seck MC, Sy N, Koita O, Krogstad DJ, Nwakanma D, Ndiaye D. Selection of N86F184D1246 haplotype of *Pfmrtd1* gene by artemether-lumefantrine drug pressure on *Plasmodium falciparum* populations in Senegal. *Malar J*. 2016 Aug 25;15(1):433. doi: 10.1186/s12936-016-1490-4.
- Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnikaa AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Thakur GD, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, Espino FE, Fandeur T, Ferreira-da-Cruz MF, Fola AA, Fuehrer HP, Hassan AM, Herrera S, Hongvanthong B, Houzé S, Ibrahim ML, Jahirul-Karim M, Jiang L,

- Kano S, Ali-Khan W, Khanthavong M, Kremsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Mazarati JB, Ménard S, Morlais I, Muhindo-Mavoko H, Musset L, Na-Bangchang K, Nambozi M, Niaré K, Noedl H, Ouedraogo JB, Pillai DR, Pradines B, Quang-Phuc B, Ramharther M, Randrianarivelosia M, Sattabongkot J, Sheikh-Omar A, Silué KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang LH, Touré OA, Tshibangu-wa-Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale JC, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O; KARMA Consortium. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med*. 2016 Jun 23;374(25):2453-64. doi: 10.1056/NEJMoa1513137.
12. Ministère de la santé et de la population de la République Centrafricaine. Rapport annuel. 2016, p1-59.
13. Mishra N, Singh JP, Srivastava B, Arora U, Shah NK, Ghosh SK, Bhatt RM, Sharma SK, Das MK, Kumar A, Anvikar AR, Kaitholia K, Gupta R, Sonal GS, Dhariwal AC, Valecha N. Monitoring anti-malarial drug resistance in India via sentinel sites: outcomes and risk factors for treatment failure, 2009-2010. *Bull World Health Organ*. 2012 Dec 1;90(12):895-904. doi: 10.2471/BLT.12.109124.
14. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 Jul-Aug;97(4):387-90. doi: 10.1016/s0035-9203(03)90065-4.
15. Mvumbi DM, Kayembe JM, Situakibanza H, Bobanga TL, Nsibu CN, Mvumbi GL, Melin P, De Mol P, Hayette MP. *falciparum* malaria molecular drug resistance in the Democratic Republic of Congo: a systematic review. *Malar J*. 2015 Sep 17;14:354. doi: 10.1186/s12936-015-0892-z.
16. Nambei WS, Biago U, Balizou O, Pounguinza S, Moya M, Ndoua C, Gody JC. Surveillance de l'efficacité d'artémether-luméfantrine dans le traitement du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* par étude des mutations des gènes *Kelch 13* à Bangui, République centrafricaine. *Med Trop Sante Int*. 2021 Mar 26;1(1). doi: 10.48327/mtsbulletin.n1.2021.82.
17. Nambei WS, Gbagba FE, Ndémanga J, Doui-Doumga B, Diallo TO, Ndadjimbaye V, Flori P, Perraut R, Garraud O. Efficacy comparison between anti-malarial drugs in Africans presenting with mild malaria in the Central Republic of Africa: a preliminary study. *Parasite*. 2005 Mar;12(1):73-7. doi: 10.1051/parasite/2005121073.
18. Ndwiga L, Kimenyi KM, Wamae K, Osoti V, Akinyi M, Omedo I, Ishengoma DS, Duah-Quashie N, Andagalu B, Ghansah A, Amambua-Ngwa A, Tukwasibwe S, Tessema SK, Karema C, Djimde AA, Dondorp AM, Raman J, Snow RW, Bejon P, Ochola-Oyier LI. A review of the frequencies of *Plasmodium falciparum* Kelch 13 artemisinin resistance mutations in Africa. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2021 Aug;16:155-161. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.06.001.
19. Nzoumbou-Boko R, Panté-Wockama CG, Ngoagani C, Petiot N, Legrand E, Vickos U, Gody JC, Manirakiza A, Ndoua C, Lombart JP, Ménard D. Molecular assessment of kelch13 non-synonymous mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Central African Republic (2017-2019). *Malar J*. 2020 May 24;19(1):191. doi: 10.1186/s12936-020-03264-y.
20. Organisation mondiale de la santé (OMS). Rapport 2024 sur le paludisme dans le monde.
21. Organisation mondiale de la santé (OMS). Lignes directrices de l'OMS sur le paludisme, 13 août 2025, 478 p.
22. Osoti V, Akinyi M, Wamae K, Kimenyi KM, de Laurent Z, Ndwiga L, Gichuki P, Okoyo C, Kepha S, Mwandawiro C, Kandie R, Bejon P, Snow RW, Ochola-Oyier LI. Targeted Amplicon Deep Sequencing for Monitoring Antimalarial Resistance Markers in Western Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 Apr 19;66(4):e0194521. doi: 10.1128/aac.01945-21.
23. Ouattara A, Kone A, Adams M, Fofana B, Maiga AW, Hampton S, Coulibaly D, Thera MA, Diallo N, Dara A, Sagara I, Gil JP, Bjorkman A, Takala-Harrison S, Doumbo OK, Plowe CV, Djimde AA. Polymorphisms in the K13-propeller gene in artemisinin-susceptible *Plasmodium falciparum* parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Jun;92(6):1202-6. doi: 10.4269/ajtmh.14-0605.
24. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*. 1997 Dec;176(6):1590-6. doi: 10.1086/514159.
24. Schmedes SE, Patel D, Dhal S, Kelley J, Svigel SS, Dimbu PR, Adeothy AL, Kahunu GM, Nkoli PM, Beavogui AH, Kariuki S, Mathanga DP, Koita O, Ishengoma D, Mohamad A, Hawela M, Moriarty LF, Samuels AM, Gutman J, Plucinski MM, Udhayakumar V, Zhou Z, Lucchi NW, Venkatesan M, Halsey ES, Talundzic E. *Plasmodium falciparum* kelch 13 Mutations, 9 Countries in Africa, 2014-2018. *Emerg Infect Dis*. 2021 Jul;27(7):1902-1908. doi: 10.3201/eid2707.203230.