

UCLouvain
Secteur des sciences de la santé



Institut de Recherche Santé et Société (IRSS)

Promoteurs: Niko Speybroeck
Paul Lusamba Dikassa



Nadine Kayiba Kalenda est médecin spécialiste en santé publique. Elle jouit d'une bonne expérience dans la lutte contre les maladies infectieuses et parasitaires en République Démocratique du Congo (RDC). Ses activités professionnelles combinent l'enseignement, la recherche et les interventions en santé publique. Ses recherches actuelles visent à appliquer les approches moléculaires afin de contribuer à la lutte contre le paludisme pharmaco-résistant en RDC et dans le monde.

La pharmaco-résistance est un obstacle majeur au contrôle du paludisme en RDC. Deux revues systématiques et trois études originales indiquent une résistance répandue du *P. falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine ainsi qu'un risque imminent d'émergence locale ou de diffusion de la résistance à l'artémisinine à partir des foyers sous régionaux. En plus, le contexte épidémiologique prévalant dans le pays est marqué par un fardeau socio-économique important du paludisme et des disparités socio-sanitaires importantes au sein de la population. Il en résulte des comportements thérapeutiques inadéquats susceptibles d'aggraver la pharmaco-résistance. Le système mis en place pour la surveillance moléculaire de cette résistance démontre des avantages épidémiologiques considérables et une faisabilité dans les conditions locales mais reste enclin à des défis financiers et organisationnels pour son implémentation effective dans la politique antipaludique nationale.

*Drug resistance is a major obstacle to malaria control in the DRC. Two systematic reviews and three original studies indicate widespread resistance of *P. falciparum* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine as well as an imminent risk of local emergence or dissemination of resistance to artemisinin from sub-regional foci. In addition, the epidemiological context prevailing in the country is marked by a significant socio-economic burden of malaria and significant socio-health disparities within the population. This results in inadequate therapeutic behaviors that can worsen drug resistance. The system put in place for the molecular surveillance of this resistance demonstrates considerable epidemiological advantages and feasibility in local conditions but remains prone to financial and organizational challenges for its effective implementation in the national antimalarial policy.*

2021

Nadine Kayiba Kalenda

Surveillance moléculaire du paludisme pharmaco-résistant en RDC



Institut de recherche santé et société

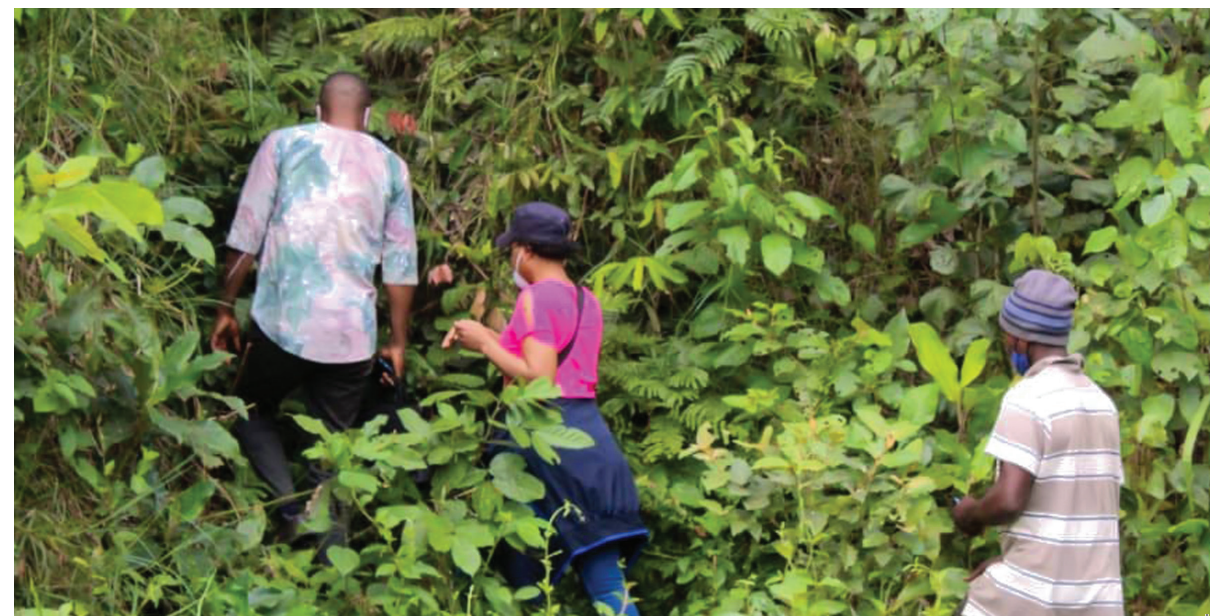
Mise en place d'un système de surveillance moléculaire de la résistance aux antipaludiques en République Démocratique du Congo : Rôle, Avantages et Défis

NADINE KAYIBA KALENDA

DÉCEMBRE 2021

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences de la santé publique

Secteur des sciences de la santé





**Université Catholique de Louvain
Institut de Recherche Santé et Société (IRSS)**

**Mise en place d'un système de surveillance moléculaire de la
résistance aux antipaludiques en République Démocratique
du Congo : rôle, avantages et défis**

Nadine Kayiba Kalenda

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de la
Santé Publique
Secteur des Sciences de la Santé

Promoteurs : **Niko Speybroeck**
Paul Lusamba Dikassa

Décembre 2021

MEMBRES DU JURY

- Présidente* : **Prof. Annie Robert**
Pôle Epidémiologie et Biostatistique, Institut de Recherche
Expérimentale et Clinique
Faculté de Santé Publique, Université catholique de Louvain,
Bruxelles, Belgique
- Promoteur* : **Prof. Niko Speybroeck**
Institut de Recherche Santé et Société
Faculté de Santé Publique, Université catholique de Louvain,
Bruxelles, Belgique
- Co-Promoteur* : **Prof. Paul Lusamba Dikassa**
Département d'Epidémiologie et Biostatistiques, Ecole de Santé
Publique
Faculté de Médecine, Université de Kinshasa, Kinshasa,
République Démocratique du Congo
- Secrétaire* : **PhD Angel Rosas-Aguirre**
Institut de Recherche Santé et Société
Faculté de Santé Publique, Université catholique de Louvain,
Bruxelles, Belgique
- Autres membres* : **Prof. Marie-Pierre Hayette**
Service de microbiologie clinique et parasitologie
Centre hospitalier universitaire de Liège
Faculté de Médecine, Université de Liège, Liège, Belgique
- Prof. Brecht Devleesschauwer**
Département de la santé publique vétérinaire et de la sécurité
alimentaire, Université de Gand, Merelbeke, Belgique
- Prof. Jean Cyr Yombi**
Service de Médecine Interne
Institut de Recherche Expérimentale et Clinique
Cliniques Universitaires Saint-Luc
Faculté de Médecine, Université catholique de Louvain,
Bruxelles, Belgique
- Membres externes* : **Prof. Philippe Beutels**
Centre d'Economie de la Santé, Recherche et Modélisation
Université d'Anvers, Anvers, Belgique
- Prof. Françoise Benoit-Vical**
Équipe des nouvelles molécules antipaludiques et approches
pharmacologiques
Laboratoire de Chimie de Coordination du Centre National de la
Recherche Scientifique – UPR8241, Toulouse Cedex, France

DEDICACE

A mon cher époux, Evariste Tshibangu
A mes enfants, Murielle Muadi et Adriel Kalenda
A toute ma famille et à tous mes ami(e)s

REMERCIEMENTS

Faire une thèse est un véritable voyage qui n'aurait pu aboutir à destination si je n'avais été bien entourée au cours de ces quatre dernières années. Je saisis cette opportunité pour adresser toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont apporté une quelconque assistance tout au long de ce voyage.

En effet, le parcours qui culmine avec cette thèse débute à la fin de mes études de Master en Santé Publique en 2016. A l'époque, je souhaitais poursuivre ma formation afin d'entamer une carrière académique et scientifique. Il était donc question de trouver une opportunité de formation doctorale, de préférence avec beaucoup d'activités de terrain au contact des populations en République Démocratique du Congo (RDC). Ce rêve n'aurait jamais pris forme si le Professeur Patrick DeMol que j'avais l'honneur d'avoir, en Master, comme enseignant de Prophylaxie des maladies transmissibles, n'avait cru en moi. De fil en aiguille, il m'avait alors présenté au Professeur Georges Mvumbi Lelo (Service de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa) et au Professeur Marie-Pierre Hayette (Service de Microbiologie Clinique et Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire de Liège) qui n'avaient pas hésité un seul instant à m'accepter au sein du projet PRD/PALU-UNIKIN dont ils assuraient la coordination. Ce projet rencontrait mes aspirations car la lutte contre le paludisme était déjà l'un de mes sujets d'intérêt scientifique depuis quelques années. C'est ensuite que je rencontrais à nouveau le Professeur Niko Speybroeck (Faculté de Santé Publique, Université catholique de Louvain) qui avait été auparavant mon enseignant d'Epidémiologie. De façon très naturel, il acceptait volontiers d'assurer la direction de ma thèse aux côtés du feu Professeur Emile Okitolonda Wemankoy (Ecole de Santé Publique, Université de Kinshasa) à qui la nature se décida d'arracher la vie alors que ce travail de thèse n'était encore qu'en gestation.

L'approche utilisée par le Professeur Niko Speybroeck pour mon encadrement au cours de cette formation doctorale a considérablement enrichi mon expérience. Je lui suis reconnaissante déjà d'avoir accepté et facilité mon inscription à l'UCLouvain et, ensuite, d'avoir accordé de son précieux temps pour diriger ma thèse en dépit de ses multiples occupations. Tout en exigeant de moi un travail de qualité, il savait aussi me laisser une liberté intellectuelle dans la réalisation de mon travail. Il s'est impliqué totalement dans ce travail au point de participer même aux descentes sur le terrain pour la collecte des données. Les échanges avec lui ne se limitaient pas qu'aux considérations théoriques tenues dans les bâtiments, mais s'étendaient aux solutions pratiques aux multiples problèmes qui se posaient sur le terrain au cours des enquêtes menées, au contact des populations aux fins fonds de la RDC. Toujours dans le souci d'un travail bien fait, il m'avait vite fait découvrir d'autres scientifiques dont les Professeurs Brecht Devleesschauwer, Philippe Beutels et Isabelle Aujoulat avec qui les échanges ont significativement contribué à améliorer la qualité de cette thèse. De ce lot de scientifiques, je tiens à remercier singulièrement le Dr Angel Rosas-Aguirre, qui, aux côtés du Professeur Speybroeck, avait accompagné avec bienveillance mes premiers pas dans cette phase d'apprentissage aussi bien sur le plan administratif que scientifique, avec sa capacité à creuser le fond des données pour y soutirer les détails. Il avait aussi accepté de m'accompagner quelques fois sur le terrain, je lui suis vraiment gré de son temps et de ses excellents conseils.

Après le départ du Professeur Okitolonda, j'avais été très honorée de voir le Professeur Paul Lusamba Dikassa (Ecole de Santé Publique, Université de Kinshasa) rejoindre notre équipe en qualité de Co-Promoteur de cette thèse. Bien qu'ayant été impliqué à mi-parcours, il s'était vite imprégné des travaux en cours et n'avait tardé à apporter des contributions pertinentes et constructives. Je suis reconnaissante pour l'intérêt scientifique très communicatif dont il a fait montre au cours des recherches menées et de la rédaction de cette thèse.

Je tiens également à remercier sincèrement tous les membres du comité d'accompagnement de cette thèse, particulièrement les Professeurs Annie-Robert et Jean Cyr Yombi, dont les commentaires, remarques et orientations formulés lors des différentes rencontres ont vraiment amélioré ce travail. Cette thèse n'aurait eu sa forme et sa teneur actuelle sans leur encadrement et leurs encouragements. Je remercie ensuite les Professeurs Françoise Benoit-Vical et Philippe Beutels pour avoir accepté de contribuer à l'amélioration de cette thèse en qualité de membre extérieure du Jury. Ma gratitude va également à l'endroit du Professeur Perrine Hoet qui avait spontanément accepté d'évaluer mon travail malgré ses occupations. En seulement quelques séances de travail au contact de toute cette équipe, j'ai énormément appris.

Ce travail de thèse m'a conduit à parcourir des kilomètres, dans des sentiers que je n'aurais jamais imaginés auparavant. J'ai visité plusieurs provinces sur la vaste étendue du pays, jusque dans des milieux très reculés qui n'étaient parfois accessibles que moyennant plusieurs heures à moto, sur des pirogues, dans des véhicules surchargés ou en avion petit porteurs. Des chemins jonchés de tous les dangers ! Braver ces défis n'aura été possible sans les encouragements quotidiens de toute l'équipe du Projet PRD/PALU-UNIKIN. Pour y parvenir, les équipes du « Nord » et du « Sud » restaient en permanence appendues en ligne sur internet lorsque j'étais en mission sur le terrain, afin de superviser en détails les différentes collectes des données. Toujours dans un climat très cordial ! De multiples et longues réunions d'échange sur l'évaluation du projet et l'avancement de la thèse ont permis non seulement d'assurer la qualité des travaux sur le terrain et au laboratoire, mais aussi de les achever dans les délais impartis. Cette thèse est ainsi profondément marquée par l'empreinte scientifique individuelle et collective des Professeurs Georges Mvumbi, Marie-Pierre Hayette, Patrick DeMol, Pius Kabututu et tout particulièrement le Professeur Dieudonné Mvumbi qui avait préparé antérieurement le cadre technique de réalisation de ce travail et qui, lors de nos multiples échanges informels, a contribué grandement à éclairer les contours de

mon projet de thèse en plus d'avoir participé significativement à l'amélioration de mes recherches. C'est aussi l'opportunité de remercier en particulier nommément le Dr Doudou Yobi et le Dr Junior Mudji, en plus de tous les médecins, infirmiers et techniciens qui ont participé aux missions de terrain aux quatre coins de la RDC. Cette thèse n'aurait pas été achevée sans les abondantes analyses de laboratoire effectuées en grande partie par Doudou Yobi mais également Vanessa Rodanis Tchakounang Kouoneyou, Raphael Boreux, Joseph Mbwangi et les autres membres du Service de Microbiologie Clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Liège et du Laboratoire de Biologie Moléculaires de la Faculté de Médecine de l'UNIKIN. Leurs apports ont été déterminants.

Cette thèse aura connu aussi l'apport apprécié de personnes de nombreux horizons. Il y a eu d'abord les facilités administratives et les apports techniques et scientifiques des membres relevant du Programme National de Lutte contre le Paludisme qui ont joué un rôle essentiel à sa conduite. Ma pensée va à l'endroit du feu Dr Solange Omesumbu Efundu qui n'aura pas vu s'achever cette thèse à laquelle elle avait consacré de son précieux temps. Le destin en a décidé autrement ! Je remercie aussi les Professeurs Erick Mukomena Sompwe et Joris Losimba Likwela ainsi que le Dr Lydie Azama Kalindula qui, au-delà de multiples assistances, avaient aussi accepté de contribuer à la publication des résultats de mes travaux. Il y a eu aussi les équipes des Professeurs Yoshio Yamaoka (Université de Oita, Japon) et Yasutoshi Kido (Université Municipale d'Osaka, Japon) qui ont accordé des facilités d'accès bibliographique et ont même contribué à la conduite des revues systématiques dans le cadre de cette thèse. J'ai également reçu des nombreux conseils et des encouragements constants de la part de plusieurs Professeurs des Universités de Mbuji-Mayi et de Kinshasa, dont notamment les Professeurs Emmanuel Kambaji, Eric Kamangu, Jean-Marie Kayembe. Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Ghislain Disashi Tumba dont les motivations et les encouragements ont grandement servi de pilier pour la poursuite de ma formation.

Avec cette thèse, une nouvelle page de mon histoire s'ouvre. Au contact de chacune des personnes ci-haut citées, au-delà des considérations scientifiques et techniques, je garderai le souvenir indélébile d'avoir davantage appris d'elles à aimer les choses bien faites et à aspirer à la loyauté, à l'intégrité et la rigueur. Ce fut un réel plaisir de les rencontrer toutes et j'ai hâte de poursuivre ou d'amorcer de nouvelles collaborations sous quelques formes !

Je voudrais remercier aussi tous mes collègues, dont font partis Sousane Mbaka, Dalau Nkamba, Diamantina Moreno-Gutierrez et tous les autres amis avec qui nous avons partagé des moments marqués par des difficultés, des échecs, mais aussi de moments de réflexion et de joie. Ils m'ont permis de surmonter plusieurs obstacles et embûches du quotidien de la doctorante que j'étais, balancée entre les séjours en Belgique et sur plusieurs sites en RDC. Il en va de même de tous les membres de la communauté IRSS (Institut de Recherche Santé et Société) qui m'accueillait avec patience et amabilité au cours de mes séjours doctoraux en Belgique. Ils n'ont jamais manifesté une quelconque hésitation lorsqu'il s'agissait de m'apporter de l'aide à résoudre certains problèmes administratifs tout au long de la période de cette thèse.

Enfin, je remercie ma famille biologique et ma belle-famille pour le soutien inconditionnel et multiforme mais combien essentiel, dans la poursuite de ma formation. Il n'a pas toujours semblé avoir un sens pour eux de me voir partir loin en mission pour plusieurs jours ou plusieurs mois. Il n'a pas toujours été facile de me voir consacrée pleinement à mes travaux de recherche pendant toutes ces années. Mais je suis consciente que je n'aurais tenu sans cette aide, d'abord en tant que mère de famille puis comme doctorante. Sans toujours comprendre ce que je faisais ou la raison de mes absences, mes parents, beaux-parents, frères, sœurs, beaux-frères, belles-sœurs, neveux et nièces m'ont toujours soutenue et je leur suis reconnaissante du fond du cœur. Je mentionne spécialement Papa Marcel Kalenda et Maman Marie Tshididi ainsi que Papa Pascal Kabamba et Maman Léandre Kasunyi dont les encouragements n'ont jamais tari. Parmi tous, mes mignons

enfants Murielle Muadi et Adriel Kalenda ont été les premiers à consentir de lourds sacrifices et à sentir le poids de ma formation et de mes multiples voyages depuis leurs plus bas âges. Finir cette thèse m'apporte un grand soulagement mais rien ne sera aussi gratifiant que le temps que je consacrerai désormais à mes enfants ! J'imagine anticipativement déjà nos moments de petites folies, de « plats sympa », d'inventions imaginaires et des histoires interminables d'écoles... Je réalise la chance que j'ai de pouvoir compter toujours sur une telle famille remplie d'amour et de résilience. Vous me donnez tant de raisons de croire en la vie ! Enfin et surtout, je remercie Evariste Tshibangu, mon cher époux, qui a été sans doute le catalyseur de cette thèse. Il a toujours su me faire sourire quand le moral n'y était pas et a supporté avec patience toutes mes humeurs dans mes moments grincheux. Je lui dis : « Merci », pour son amour au quotidien et surtout pour sa complicité. « Ensemble tout devient possible ! ».

Je ne saurais terminer sans témoigner toute ma gratitude au Gouvernement Belge qui, par le truchement de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES), m'avait octroyé des bourses ayant permis que je poursuive successivement mes études en Master de Spécialisation et ma formation doctorale.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1** : Evolution des cas de paludisme en RDC de 2014 à 2018
- Figure 1.2** : Historique de la politique antipaludique en RDC
- Figure 1.3** : Organisation de la lutte antipaludique en RDC par le PNLP
- Figure 2.1** : Historique de l'émergence de la résistance aux différents antipaludiques dans le monde
- Figure 2.2** : Protocole de l'OMS pour le TET de différents médicaments antipaludiques vis-à-vis de l'espèce *P. falciparum*
- Figure 2.3** : Processus de prise de décision basé sur les résultats des TET impliquant les CTA
- Figure 2.4** : Facteurs contribuant au développement des résistances aux antipaludiques et impact de celles-ci en santé publique
- Figure 4.1** : Diagramme PRISMA de la revue systématique
- Figure 4.2** : Cartes géographiques affichant les proportions d'isolats porteurs de mutations non-synonymes du *PfK13* en Afrique
- Figure 4.3** : Carte moléculaire des allèles observés dans le domaine de l'hélice du *PfK13* des isolats africains de *P. falciparum*
- Figure 4.4** : Cartes géographiques affichant les sites d'échantillonnage qui ont enregistré des isolats porteurs des marqueurs moléculaires de la *PfART-R* en Afrique
- Figure 4.5** : Evolution de la déclaration des marqueurs moléculaires *PfART-R* au cours de la période 2014-2018
- Figure 5.1** : Diagramme PRISMA de la revue systématique
- Figure 5.2** : Distribution géographique des parasites porteurs de la mutation *PfCRT K76T* associée à la *PfCQ-R* en RDC
- Figure 5.3** : Distribution de différents haplotypes répertoriés du 72ème au 76ème codon du *PfCRT* en RDC
- Figure 5.4** : Fréquence et distribution géographique des parasites du *P. falciparum* porteurs des mutations du *PfK13* potentiellement liées à la *PfART-R* en RDC
- Figure 5.5** : Fréquence et distribution géographique des parasites du *P. falciparum* porteurs des mutations du *PfDHPS* en RDC
- Figure 5.6** : Fréquence et distribution géographique des parasites du *P. falciparum* porteurs de mutations du *PfDHFR* en RDC
- Figure 7.1** : Carte géographique des sites d'échantillonnage en RDC
- Figure 7.2** : Diagramme en tornade de l'analyse probabiliste de sensibilité (PSA) des coûts moyens par épisode palustre simple en RDC
- Figure 8.1** : Schéma du fonctionnement du système de surveillance de la résistance aux antipaludiques en RDC tel que mis en place par le LBMFM/UNIKIN
- Figure 8.2** : Sites sélectionnés pour la surveillance des parasites résistants aux antipaludiques en RDC

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.1** : Les sites sentinelles pour la surveillance des stratégies antipaludiques du PNLP en RDC
- Tableau 1.2** : Indicateurs de surveillance de lutte contre le paludisme en RDC
- Tableau 2.1** : Distribution spatiale de la pharmacorésistance du *Plasmodium* dans le monde
- Tableau 2.2** : Mécanismes fondamentaux de la résistance aux antipaludiques
- Tableau 2.3** : Méthodes pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques
- Tableau 2.4** : Les marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques
- Tableau 4.1** : Critères de sélection des articles sur la base de l'algorithme PICOS
- Tableau 5.1** : Stratégie utilisée pour la recherche des articles publiés et inclus dans l'étude
- Tableau 5.2** : Critères PICOS de sélection des articles
- Tableau 6.1** : Caractéristiques sociodémographiques et obstétricales des parturientes
- Tableau 6.2** : Caractéristiques cliniques des nouveau-nés
- Tableau 6.3** : Modèle final de régression logistique identifiant les variables associées au paludisme maternel à l'accouchement
- Tableau 6.4** : Modèle de régression logistique univarié évaluant l'effet de doses croissantes de SP sur différents résultats cliniques indésirables chez les parturientes et leurs nouveau-nés
- Tableau 6.5** : Fréquence des génotypes de *Pf*DHFR et *Pf*DHPS des isolats de *P. falciparum* retrouvés chez les parturientes
- Tableau 7.1** : Caractéristiques socio-économiques de base des patients atteints de paludisme non compliqué en RDC
- Tableau 7.2** : Caractéristiques socio-économiques des patients impaludés titulaires d'une police d'assurance maladie en RDC
- Tableau 7.3** : Comparaison du score de l'indice EQ-5D dans différentes catégories de patients atteints de paludisme non compliqué en RDC
- Tableau 7.4** : Modèle bêta de régression linéaire généralisée pour le poids de désutilité (DW) au cours du paludisme non compliqué en RDC
- Tableau 7.5** : Modèle de régression linéaire généralisée pour le temps perdu chez les individus économiquement actifs (≥ 15 ans) atteints de paludisme non compliqué en RDC
- Tableau 7.6** : Coûts économiques totaux associés au paludisme non compliqué du point de vue du patient, estimés à partir de l'enquête en RDC
- Tableau 8.1** : Profil de base des sujets interrogés dans l'étude
- Tableau 8.2** : Activités de surveillance de marqueurs moléculaires de la résistance observées entre 2017 et 2021
- Tableau 8.3** : Analyse SWOT des facteurs affectant la faisabilité du système de surveillance épidémiologique des parasites porteurs des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques en RDC

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
A-L	: Combinaison artéméther-luméfantrine
AIC	: Critère d'information d'Akaike
APT	: Accouchement prématuré
AQ	: Amodiaquine
ARES	: Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur
ARN	: Acide ribonucléique
ART	: Artémisinine
AS	: Artésunate
AS-AQ	: Combinaison artésunate-Amodiaquine
AS-MQ	: Combinaison artésunate-méfloquine
AT	: Atovaquone
ATM	: Artéméther
BTB/POZ	: “Broad complex, Tramtrack and Bric à brac” ou “POxvirus and Zinc finger”
CPN	: Consultations prénatales
CPS	: Consultations préscolaires
CQ	: Chloroquine
CS	: Centre de santé
CTA	: Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
DBS	: Tache de sang séchée
DDT	: Dichlorodiphényltrichloroéthane
DfID	: Département Britannique du Développement International
DHA	: Dihydroartémisinine
DHA-PIP	: Combinaison dihydroartémisinine-pipéraquline
<i>dhfr</i>	: Gène de la dihydrofolate réductase
<i>dhps</i>	: Gène de la dihydroptéroate synthase
DW	: Poids de désutilité (Disutility Weight)
EDS	: Enquête démographique et de santé
EQ VAS	: Echelle visuelle analogique du Groupe EuroQol
EQ-5D	: Score de l'indice descriptif de l'état de santé en cinq dimensions du Groupe EuroQol
EQ-5D-3L	: Système descriptif de l'état de santé en cinq dimensions et trois niveaux du Groupe EuroQol
FMI	: Fonds Mondial International
FPN	: Faible poids à la naissance
FRP	: Initiative « Faire Reculer le Paludisme »
GLM	: Modèles linéaires généralisés

Hb	: Hémoglobine
HGR	: Hôpital Général de Référence
HRP2	: Protéine 2 riche en histidine
HRQL	: Qualité de vie liée à la santé
IQR	: Intervalle interquartile
IRSS	: Institut de Recherche Santé et Société
ISO	: International Organisation for Standardization
KOICA	: Agence Coréenne de Coopération Internationale
L	: Luméfantrine
LSR	: Living Systematic Review
MIILDA	: Moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action
MMR	: Marqueurs moléculaires de la résistance
MQ	: Méfloquine
NOS	: Newcastle-Ottawa Scale
NS	: Non-synonyme
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
P	: Pyriméthamine
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PEV/LMTE	: Programme Elargi de Vaccination et de Lutte contre les Maladies Transmissibles de l'Enfance
<i>Pf</i>ART-R	: Résistance du <i>P. falciparum</i> à l'artémisinine
<i>Pf</i>CQ-R	: Résistance de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine
<i>Pf</i>CRT	: La protéine " <i>Plasmodium falciparum</i> chloroquin resistance transporter"
<i>Pf</i>CYTB	: La protéine du Cytochrome B du <i>P. falciparum</i>
<i>Pf</i>DHFR	: La dihydrofolate réductase de <i>P. falciparum</i>
<i>Pf</i>DHPS	: La dihydropteroate syntase de <i>P. falciparum</i>
<i>Pf</i>K13	: La protéine kelch 13 du <i>P. falciparum</i>
<i>Pf</i>MDR1	: La protéine <i>Plasmodium falciparum</i> multi-drug resistance 1
<i>Pf</i>MDR2	: La protéine <i>Plasmodium falciparum</i> multi-drug resistance 2
<i>Pf</i>NHE1	: La protéine échangeuse de Na ⁺ /H ⁺ du <i>P. falciparum</i>
<i>Pfpm</i> 2,3	: Genes des plasmepsines 2 et 3
<i>Pf</i>SP-R	: Résistance de <i>P. falciparum</i> à la sulfadoxine-pyriméthamine
PIB	: Produit Intérieur Brut
PICOS	: Population, Intervention, Comparator, Outcomes, and Study design
PID	: Pulvérisation intradomiciliaire
PIP	: Pipéraquine
PLAP	: Projet de Lutte Anti Paludique
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme

PNN	: Poids normal de naissance
PR	: Primaquine
PRO	: Proguanil
PSA	: Analyses de sensibilité probabilistes
PSN	: Plan Stratégique National
PYR	: Pyronaridine
PYR-AS	: Combinaison pyronaridine-artésunate
QN	: Quinine
qPCR	: Amplification en chaîne par polymérase quantitative
RDC	: République Démocratique du Congo
RFLP	: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
S	: Sulfadoxine
S-P	: Combinaison sulfadoxine-pyriméthamine
SD	: Ecart type
SE	: Erreur standard
SNIS	: Système National d'Information Sanitaire
Syn	: Synonyme
TDR	: Test de diagnostic rapide
TET	: Test d'efficacité thérapeutique
TPI	: Traitement préventif intermittent
TPIe-SP	: Traitement préventif intermittent à base de la sulfadoxine-pyriméthamine chez l'enfant
TPIg-SP	: Traitement préventif intermittent à base de la sulfadoxine-pyriméthamine pendant la grossesse
UNICEF	: Fond International d'Urgence des Nations Unies pour l'Enfance
UNIKIN	: Université de Kinshasa
USAID/PMI	: Initiative du Président Américain contre le paludisme
UV	: Ultraviolet
VIH/SIDA	: Virus de l'immunodéficience humaine / Syndrome d'immunodéficience acquise
WT	: “Wild type” ou type sauvage
ZS	: Zone de Santé

TABLE DES MATIERES

MEMBRES DU JURY	i
DEDICACE	ii
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABREVIATIONS	xi
TABLE DES MATIERES	xiv
RESUME	xvii
SUMMARY	xix
 INTRODUCTION.....	 1
Contexte.....	1
Objectifs	4
Organisation de la thèse.....	4
 CHAPITRE 1. ORGANISATION DE LA LUTTE ANTIPALUDIQUE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO	 7
1.1. Aspects épidémiologiques du paludisme en RDC	7
1.2. Historique de la lutte antipaludique en RDC	9
1.3. Organisation de la lutte antipaludique en RDC	11
1.4. Les stratégies de la lutte antipaludique en RDC	13
1.5. Le financement des activités de lutte antipaludique en RDC.....	16
 CHAPITRE 2. GENERALITES SUR LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES ET SES IMPLICATIONS EN SANTE PUBLIQUE	 19
2.1. Définition des concepts	19
2.2. Historique et épidémiologie de la résistance aux médicaments antipaludiques.	20
2.3. Mécanismes fondamentaux de résistance aux antipaludiques	25
2.4. Méthodes de surveillance de la résistance aux antipaludiques	26
2.5. Facteurs contribuant au développement de la résistance aux antipaludiques et impact en Santé Publique	40
2.6. Mesures de santé publique contre les résistances aux antipaludiques	43
 CHAPITRE 3. METHODOLOGIE GENERALE	 45
3.1. Cadre d'étude de la thèse.....	45
3.2. Conception de la thèse.....	46
3.3. Définitions – mutation, allèle et haplotype	48

CHAPITRE 4. CARTOGRAPHIE SPATIALE ET MOLECULAIRE DU POLYMORPHISME DU GENE <i>PfK13</i> EN AFRIQUE A L'ERE DE L'EMERGENCE DE LA RESISTANCE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> A L'ARTEMISININE : UNE REVUE SYSTEMATIQUE.....	51
4.1. Résumé	51
4.2. Introduction	52
4.3. Méthodes	53
4.4. Résultats	57
4.5. Discussion.....	64
4.6. Conclusion.....	69
CHAPITRE 5. CARTOGRAPHIE SPATIO-TEMPORELLE DE LA SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO : EVIDENCES DECOULANT D'UNE LIVING SYSTEMATIC REVIEW	71
5.1. Résumé	71
5.2. Introduction	72
5.3. Méthodes	74
5.4. Résultats	78
5.5. Discussion.....	86
5.6. Conclusion.....	93
CHAPITRE 6. EVALUATION DE L'UTILITE DU TRAITEMENT PREVENTIF INTERMITTENT DU PALUDISME PENDANT LA GROSSESSE PAR SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE DANS UN CONTEXTE DE RESISTANCE ACCRUE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> A L'HOPITAL DE KINGASANI A KINSHASA EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO	95
6.1. Résumé.....	95
6.2. Introduction.....	97
6.3. Méthodes.....	98
6.4. Résultats	102
6.5. Discussion	107
6.6. Conclusion	112
CHAPITRE 7. COMPORTEMENTS DE RECHERCHE DE SOINS ET POIDS SOCIO-ECONOMIQUE ASSOCIES AU PALUDISME NON COMPLIQUE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO	115
7.1. Résumé	115
7.2. Introduction	117
7.3. Méthodes	119
7.4. Résultats	126

7.5. Discussion.....	135
7.6. Conclusion.....	143
CHAPITRE 8. EVALUATION DE LA FAISABILITE DE LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO : ROLE, AVANTAGES ET DEFIS DE L'INTEGRATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE DANS LA POLITIQUE NATIONALE ANTIPALUDIQUE.....	
8.1. Résumé	145
8.2. Introduction	147
8.3. Méthodes	148
8.4. Résultats	153
8.5. Discussion.....	164
8.6. Conclusion.....	170
CHAPITRE 9. DISCUSSION GENERALE	173
CONCLUSION GENERALE	183
PERSPECTIVES.....	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
ANNEXES	215

RESUME

La résistance médicamenteuse constitue un obstacle majeur aux efforts de lutte antipaludique. Une surveillance épidémiologique adéquate de cette résistance est essentielle pour l'élaboration des stratégies antipaludiques nationales et sous régionales qui soient efficaces. Deux revues systématiques et trois études originales ont été conduites, de 2017 à 2021, en lien avec l'établissement d'un système destiné à assurer une surveillance moléculaire du paludisme pharmaco-résistant en République Démocratique du Congo (RDC). Ces études visaient à analyser le contexte épidémiologique de cette résistance à travers le pays et la sous-région et à évaluer la faisabilité du système de surveillance nouvellement établi. Les résultats indiquent une résistance répandue du *P. falciparum* face à la chloroquine (*Pf*CRT K76T = 32,1%) et à la sulfadoxine-pyriméthamine (*Pf*DHPS A437G = 97,7% et K540E = 45,2%), une suspicion possible d'une résistance variable développée à la quinine (*Pf*MDR1 D1246Y), à la luméfantrine (*Pf*MDR1 N86Y et Y184F) et à l'amodiaquine (*Pf*MDR1 N86Y). Par contre, la résistance à l'artémisinine, apparue récemment en Afrique de l'Est, n'a été démontrée que sur des cas sporadiques (*Pf*K13 R561H) dans le pays. Toutefois, il se profilait un risque imminent d'émergence locale ou de diffusion de cette résistance à partir des foyers sous régionaux identifiés. Par ailleurs, le contexte épidémiologique national était marqué par un coût élevé des soins antipaludiques, un poids social élevé lié à la maladie et d'importantes disparités dans la délivrance des soins, conduisant à des comportements thérapeutiques inadéquats pouvant servir de fond au développement de la pharmaco-résistance. Cependant, des mécanismes pour surveiller la pharmaco-résistance et guider les stratégies antipaludiques restaient quasi-inexistants. Nonobstant une signification clinique sujette à des précautions au niveau individuel, la surveillance moléculaire de la résistance aux antipaludiques venait donc répondre à un besoin réel et s'est avérée réalisable et pertinente sur le

plan épidémiologique. Il s'agit, en effet, d'un outil de surveillance de masse, en routine de la résistance à plusieurs médicaments y compris ceux déjà retirés de la pratique clinique. Cet outil rend possible la cartographie de la résistance dans la population en incluant les sujets asymptomatiques, réservoir potentiel des parasites résistants. Désormais, un plaidoyer continu et un financement conséquent sont nécessaires pour assurer la pérennité et l'intégration effective du nouvel outil de surveillance dans les stratégies sanitaires nationales visant le contrôle et l'élimination du paludisme ainsi que l'allègement de son poids socio-économique dans la population.

SUMMARY

Drug resistance is a major obstacle to malaria control efforts. Adequate epidemiological surveillance of this resistance is essential for the development of effective national and subregional antimalarial strategies. Two systematic reviews and three original studies were conducted, from 2017 to 2021, in connection with the establishment of a system for molecular surveillance of drug-resistant malaria in the Democratic Republic of Congo (DRC). These studies aimed to analyze the epidemiological context of this resistance across the country and the sub-region and to assess the feasibility of the newly established surveillance system. The results indicate widespread resistance of *P. falciparum* to chloroquine (*Pf*CRT K76T = 32.1%) and sulfadoxine-pyrimethamine (*Pf*DHPS A437G = 97.7% and K540E = 45.2%), a possible suspicion of a variable resistance developed to quinine (*Pf*MDR1 D1246Y), to lumefantrine (*Pf*MDR1 N86Y and Y184F) and to amodiaquine (*Pf*MDR1 N86Y). In contrast, resistance to artemisinin, which has recently appeared in East Africa, has only been demonstrated in sporadic cases (*Pf*K13 R561H) in the country. However, there was an imminent risk of local emergence or spread of this resistance from the identified sub-regional foci. In addition, the national epidemiological context was marked by a high cost of antimalarial care, a high social burden linked to the disease and significant disparities in the delivery of care, leading to inadequate therapeutic behaviors that would serve as a basis for the development of drug resistance. However, mechanisms to monitor this drug resistance and guide antimalarial strategies remained almost non-existent. Notwithstanding the clinical relevance subject to precautions at the level of individual cases, molecular surveillance of antimalarial drug resistance therefore met a real need and proved to be feasible and epidemiologically relevant. It is, in fact, a tool for mass and routine surveillance of resistance to several drugs, including those already withdrawn from clinical

practice. This tool makes it possible to map resistance in the population by including asymptomatic subjects, a potential reservoir for resistant parasites. From now on, continued advocacy and substantial funding are necessary to ensure the sustainability and effective integration of the new surveillance tool into national health strategies aimed at controlling and eliminating malaria as well as reducing its socio-economic burden in the population.

INTRODUCTION

Contexte

La République Démocratique du Congo (RDC) occupe la 2^{ème} place dans le monde en termes des cas et décès associés au paludisme [1]. Comme ailleurs en Afrique subsaharienne, outre sa morbi-mortalité élevée, le paludisme détournerait d'importantes ressources financières des individus et du pays vers les efforts de prévention et de traitement [2, 3]. Ainsi, un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) organisé depuis 1998 s'occupe de la conception et la mise en œuvre, de manière opérationnelle et intégrée, de la politique nationale de lutte antipaludique. Les stratégies ayant été adoptées par le PNL se sont inscrites en ligne droite des recommandations successives formulées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'initiative « Faire reculer le paludisme » (FRP) ainsi que les résultats des études cumulées sur le terrain en RDC [4]. A la suite de ces stratégies, au cours de la dernière décennie, d'importants progrès ont été rapportés dans la lutte antipaludique nationale [4]. Mais ces progrès accomplis restent en permanence menacées par l'émergence et l'expansion de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques usuels [5]. En effet, des résistances aux molécules antipaludiques sont notées depuis plusieurs années sur différents sites dans le pays et parfois à des taux élevés [6]. La lutte contre ces résistances devrait ainsi être un maillon important de la politique antipaludique nationale.

Dans la littérature médicale, les facteurs à l'origine du développement de la résistance aux antipaludiques peuvent être liés à l'hôte humain, au parasite, au système de santé, à la biologie du vecteur de la maladie et aux molécules utilisées comme médicaments [7-9]. Une fois fixée dans la population, de façon fondamentale, la résistance aux antipaludiques a des conséquences cliniques (ex. échec thérapeutique, perte d'effet prophylactique) et épidémiologiques (ex. morbi-

mortalité supplémentaire du paludisme), mais aussi des implications socio-économiques importantes (ex. coûts de soins accrus liés aux retraitements), et alourdit le fardeau pesant sur des systèmes de santé souvent déjà fragiles [7, 8]. Les interventions de santé publique nécessaires à mettre en œuvre pour lutter contre l'émergence de la résistance aux antipaludiques et pour atténuer son impact devraient donc cibler également ces différents facteurs. Il peut s'agir des mesures pour l'amélioration du comportement de recherche de soins de santé par les individus et pour réduire la pression médicamenteuse sur la population par le développement des politiques thérapeutiques alternatives [10]. La surveillance épidémiologique des parasites résistants est un pivot essentiel pour toutes ces mesures de santé publique [11]. En effet, elle fournit des preuves essentielles pour la prise de décision, l'établissement des priorités et l'affectation des ressources ainsi que pour soutenir (ou remettre en question) le développement de nouvelles stratégies [8]. Elle est cruciale pour l'évaluation de l'ampleur et l'estimation de l'impact des résistances médicamenteuses sur la population en vue d'éclairer la politique sanitaire et d'élaborer les plans réajustés pour une meilleure lutte antipaludique [12]. Elle peut servir également de base pour l'analyse coûts / bénéfices des interventions proposées. C'est donc à juste titre que, dans son exercice récent (Plan Stratégique 2016-2020), le PNLP avait dévolu un de ses axes stratégiques-clés au renforcement de son système de surveillance épidémiologique avec un volet de surveillance des résistances médicamenteuses [13]. Cette surveillance de la résistance dans le pays est d'autant plus critique qu'à l'ère actuelle des thérapies combinées à base d'artémisinine (ACT), des actions proactives de santé publique sont requises pour devancer l'installation et la propagation de la résistance émergente à l'artémisinine et prolonger l'utilité clinique de ces médicaments en RDC et ailleurs en Afrique [14].

L'évaluation et la surveillance épidémiologique de la résistance aux antipaludiques reposent actuellement sur trois approches principales: les essais *in vivo*, les essais *in vitro* / *ex vivo* et la détection des marqueurs moléculaires de la résistance (MMR)

aux médicaments [1, 11]. Considérées de façon isolée, ces méthodes présentent des avantages, exigences techniques et limites propres devant être pris en compte lors de leur implémentation dans la politique antipaludique d'un pays [11]. Considérées de façon globale, ces approches sont complémentaires et devraient idéalement être associées dans une approche intégrale capable de capturer le meilleur tableau de l'épidémiologie de la résistance pour les décideurs politico-sanitaires [11]. Néanmoins, dans un contexte de ressources limitées, l'OMS préconise l'utilisation possible d'une seule méthode appliquée périodiquement (au maximum tous les 24 mois et à la même période de l'année) pour la surveillance épidémiologique des résistances aux antipaludiques [15]. Parmi ces trois méthodes, la surveillance par les MMR semble offrir de nombreux avantages sur les autres approches.

Un système national de surveillance des MMR a été mis sur pied en RDC et organisé de 2016 à 2020. Il s'agissait d'un Projet de Recherche pour le Développement (PRD) financé par le Gouvernement belge à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES). C'est dans le cadre de ce PRD que deux thèses complémentaires ont été conjointement conduites en abordant deux aspects – en Santé Publique et en Biologie Moléculaire – de la mise en œuvre de cette surveillance des MMR. La thèse en Biologie Moléculaire s'est attelée ainsi à établir les procédures de laboratoire pour la détection et la surveillance des MMR dans les conditions de la RDC. Et la présente thèse, axée sur les aspects de Santé Publique du projet, s'est proposée spécifiquement de faire un état des lieux sur la pharmaco-résistance du *P. falciparum* ainsi que d'explorer l'environnement et les outils utilisés pour la surveillance de cette résistance en RDC. Cette thèse s'est proposée également d'analyser la faisabilité du système de surveillance mis en place afin d'en discuter le rôle, l'impact possible en santé publique, mais aussi les éventuels défis à surmonter pour son implémentation, en tenant compte du contexte propre de la RDC, en étendant la réflexion à tout le continent Africain sur lequel la menace des parasites résistants aux antipaludiques pèse.

Objectifs

Objectif global

Globalement, l'objectif de cette thèse est de contribuer au renforcement de la politique nationale de lutte contre le paludisme pharmaco-résistant en RDC.

Objectifs spécifiques

Spécifiquement, ce travail vise à :

1. Evaluer la fréquence et analyser la distribution géographique des parasites du paludisme pharmaco-résistant sur l'étendue de l'Afrique et de la RDC ;
2. Analyser les comportements humains en lien avec le recours aux soins antipaludiques, le coût économique de la maladie, la qualité de vie des patients et le poids de l'invalidité occasionnés par le paludisme non compliqué à *P. falciparum* en RDC ;
3. Evaluer la faisabilité, le rôle, les avantages et les contraintes de l'implémentation d'un programme de surveillance régulière et à large spectre de la résistance des MMR dans la politique antipaludique nationale en RDC.

Organisation de la thèse

Ce travail de thèse est subdivisé en quatre grandes sections.

- La **première partie** présente une introduction générale à la thèse qui inclut la problématique et les objectifs du travail.
- Puis suit la **deuxième partie**, consacrée à la synthèse bibliographique. Cette partie fait le point sur le système sanitaire en RDC, l'état de la lutte antipaludique et les mécanismes de surveillance épidémiologique au sein du PNLP (**Chapitre 1**). Elle permet ainsi de circonscrire le contexte dans lequel tout le travail de la thèse est mené. Cette partie se poursuit avec des généralités

sur les résistances aux antipaludiques et leurs implications en santé publique (**Chapitre 2**). Le but est de résumer les bases théoriques et les notions fondamentales sur la résistance aux antipaludiques ainsi que les moyens disponibles pour les contrôles dans une population.

- Ensuite vient la **troisième partie**, consacrée aux investigations, et qui présente l'approche méthodologique globalement utilisée au cours de ce travail de thèse ainsi que des définitions de quelques concepts ayant été employés (**Chapitre 3**). Cette partie sera dévolue également aux résultats des recherches menées sur le terrain, leur interprétation et leur discussion globale.
 - ✓ Premièrement, la question de la résistance à l'artémisinine (ART) et ses dérivés en Afrique est abordée (**Chapitre 4**). En mettant en lumière la problématique de l'émergence de la résistance à l'ART en Afrique comme étant une menace majeure aux efforts globaux de la lutte antipaludique, ce chapitre traite de l'importance et du rôle de la surveillance épidémiologique des marqueurs de résistance à l'ART et des activités devant être proactivement lancées pour contrer cette résistance au niveau sous régional.
 - ✓ Deuxièmement, un état des lieux est fait sur le paludisme pharmaco-résistant en RDC (**Chapitre 5**). Le but est d'évaluer l'importance épidémiologique de la résistance aux différents antipaludiques utilisés dans le pays, tout en construisant une base de référence pour leur monitoring à l'échelle nationale prenant en compte les éventuelles variations temporo-spatiales.
 - ✓ Troisièmement, la discussion est dévolue à l'utilité épidémiologique de la surveillance des MMR à la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) chez les femmes enceintes dans le contexte de la RDC (**Chapitre 6**). Le but poursuivi est d'entrevoir l'impact que la résistance à la combinaison thérapeutique pourrait avoir sur le bénéfice prophylactique escompté du

traitement préventif intermittent, afin de discuter de l'importance de sa surveillance.

- ✓ Quatrièmement, afin d'explorer l'environnement général dans lequel le développement du paludisme pharmaco-résistant pourrait être encre, nous avons exploré les comportements caractérisant la quête des soins antipaludiques et le fardeau socio-économique de ces soins sur les patients impaludés (**Chapitre 7**). Les déterminants des recours et des coûts des soins antipaludiques pouvant impacter la mise en œuvre des mesures antipaludiques et éventuellement l'émergence des parasites résistants en RDC sont aussi discutés.
- ✓ Cinquièmement, à travers une étude qualitative, nous présentons une analyse descriptive et critique du système de surveillance des parasites porteurs des MMR aux antipaludiques tel que mis en place à travers cette thèse, en démontrant son rôle, ses avantages, ses défis dans le contexte propre de la RDC (**Chapitre 8**).
- ✓ Sixièmement, une discussion globale vient couronner les résultats trouvés afin de les présenter dans une plus large perspective (**Chapitre 9**). Cette discussion cadre avec la place des MMR comme outil de surveillance épidémiologique de la résistance aux antipaludiques, la signification épidémiologique de ces MMR et les perspectives du développement futur d'un système de surveillance intégrale des résistances aux antipaludiques.
- Une **quatrième partie** apporte une conclusion générale à la thèse et propose des perspectives globales de santé publique à mettre en œuvre au-delà de la surveillance épidémiologique, pour réduire ou prévenir le développement de la pharmaco-résistance en RDC.

Finalement, la thèse est clôturée par une liste des références bibliographiques et des annexes aux différents chapitres, y compris un CV et les listes des publications et communications scientifiques.

CHAPITRE 1. ORGANISATION DE LA LUTTE ANTIPALUDIQUE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

1.1. Aspects épidémiologiques du paludisme en RDC

La République Démocratique du Congo (RDC) est l'un des pays les plus affectés par le paludisme [16]. En effet, le paludisme constitue la première cause de morbidité et de mortalité dans le pays, représentant plus de 44% de toutes les consultations externes avec un taux de mortalité proportionnelle de 22 % [17-20]. L'Enquête Sociodémographique (EDS) 2013-2014 et le rapport supplémentaire sur le paludisme ont montré une prévalence nationale du paludisme chez les enfants âgés de 6 à 59 mois allant de 23 % à 34 % avec 22,7% pour la microscopie, 30,9 % pour les tests de diagnostic rapide du paludisme (TDR) et 34,1 % pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La prévalence augmentait avec l'âge et était plus élevée dans les zones rurales que dans les zones urbaines [20]. En plus des pertes en vies humaines, le paludisme coûte cher en dépenses de santé publique, et est responsable d'absentéisme à l'école et au travail [21]. L'OMS estime que, contrairement aux progrès notés globalement dans la lutte antipaludique avec la réduction de l'incidence entre 2010 et 2018, le fardeau de la maladie a augmenté de 7% dans la population à risque, passant de 305 à 326 pour 1000 avec des taux de mortalité persistant à environ 0,51 pour 1000 en RDC [16, 22]. Ceci est également perceptible dans l'incidence croissante des cas de paludisme rapportée par le PNLP ces dernières années (**Figure 1.1**). Cette situation serait due au manque de financement et à la fragilité du système de santé à l'origine d'une restriction de l'accès aux interventions essentielles avec compromission de la réalisation des objectifs de santé dans le pays [16, 22].

La transmission du paludisme en RDC est très hétérogène à cause des variations éco-climatiques et environ 97% de la population congolaise vit dans les zones à paludisme stable [18, 23]. Trois espèces de *Plasmodium* sont établies en RDC

notamment *P. falciparum*, l'espèce la plus fréquente représentant environ 95% de toutes les infections et retrouvé soit en mono-infection (90,4%) soit en co-infection avec *P. malariae* (4,9%) ou *P. ovale* (0,6%) [24]. Un certain nombre des publications ont signalé la présence de *P. vivax* en RDC [18, 23, 25, 26]. Toutefois, en raison d'une confusion possible entre *P. vivax* et *P. ovale* en microscopie et de l'absence du trait Duffy empêchant la transmission endémique de *P. vivax* dans une grande partie de l'Afrique subsaharienne, il est difficile d'interpréter ces données. Des recherches supplémentaires sur l'épidémiologie des infections à *P. vivax* en RDC devraient être entreprises pour élucider cette question [27].

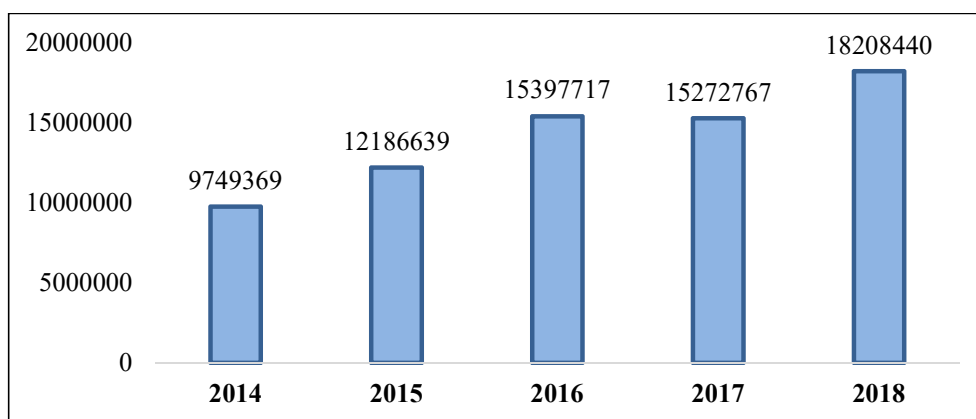


Figure 1.1. Evolution des cas de paludisme en RDC de 2014 à 2018 [19].

A la base de la transmission de ces espèces plasmodiales, les vecteurs prédominants en RDC sont les moustiques des espèces *Anopheles*, notamment *A. gambiae* et *A. funestus* avec plusieurs vecteurs secondaires présents dans différentes parties du pays, notamment *A. nili*, *A. moucheti*, *A. brunnipes*, *A. paludis* et *A. hancocki* [23, 28, 29]. Depuis 2009, une réduction de la sensibilité de ces espèces aux insecticides a été notée et constitue un problème d'importance grandissante dans le pays [30, 31]. *A. gambiae*, le vecteur le plus fréquent (92%), est actuellement résistant aux insecticides notamment au DDT

(Dichlorodiphényltrichloroéthane) et aux pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine) [32].

1.2. Historique de la lutte antipaludique en RDC

La **Figure 1.2** présente les faits historiques ayant marqué la mise en place du PNLP et le développement de différentes stratégies antipaludiques nationales en réponses à l'émergence des résistances aux antipaludiques en RDC. Ainsi donc, les efforts nationaux de lutte contre le paludisme en RDC ont pris forme en 1977 avec la création du Projet de Lutte Anti Paludique (PLAP) au sein du Ministère de la Santé [4]. En 1982, le PLAP a été intégré, sous forme d'un volet d'activités, au Programme Elargi de Vaccination et de Lutte contre les Maladies Transmissibles de l'Enfance (PEV/LMTE). Plus tard, l'engagement accru du Ministère de Santé Publique de pouvoir réduire l'impact du paludisme sur la population congolaise s'est traduit par la création, en 1998, du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) avec comme mission, de concevoir et de mettre en œuvre la politique nationale de lutte antipaludique afin de contribuer à la réduction de la morbi-mortalité et des pertes socio-économiques attribuables au paludisme [23, 25]. Ce programme a adopté les recommandations de l'initiative « Faire Reculer le Paludisme » (FRP) depuis 2001, qu'il s'est, de ce fait, engagé à mettre en œuvre avec l'appui de tous ses partenaires au développement en synchronisant ses stratégies au niveau national avec les efforts adoptées au niveau mondial et régional [23, 25, 33, 34]. Depuis, une politique nationale de lutte contre le paludisme a été définie avec des plans stratégiques successivement élaborés au niveau national [13, 23, 25, 35, 36]. Les stratégies adoptées ont démontré leur efficacité et permis d'enregistrer globalement une baisse de la morbidité et de la mortalité palustres notamment au cours des dix dernières années [4, 18].

Cependant, les efforts accomplis par le PNLP sont restés en permanence sous la menace de l'émergence et l'expansion de la résistance du paludisme aux

antipaludiques impliquant l'adoption des changements successifs de la politique médicamenteuse nationale. En effet, c'est autour des années 80 que la RDC enregistre ses premiers cas de résistance à la chloroquine (CQ) du *P. falciparum* qui conduisirent à une augmentation sensible des admissions et de la mortalité palustre. Face à la progression de cette résistance à la CQ, le PNLP avait adopté la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) en 2002 comme traitement de première ligne contre le paludisme [25, 36]. Pour ce faire, devant fonder ses nouvelles politiques sur des décisions basées sur des données factuelles, un des fondements de l'initiative FRP, le PNLP et ses partenaires avaient dû mettre en œuvre une série d'études à travers les sites sentinelles de surveillance du paludisme devant évaluer *in vivo* l'efficacité des antipaludiques utilisés dans le traitement des cas de paludisme non compliqué [4, 25, 36].

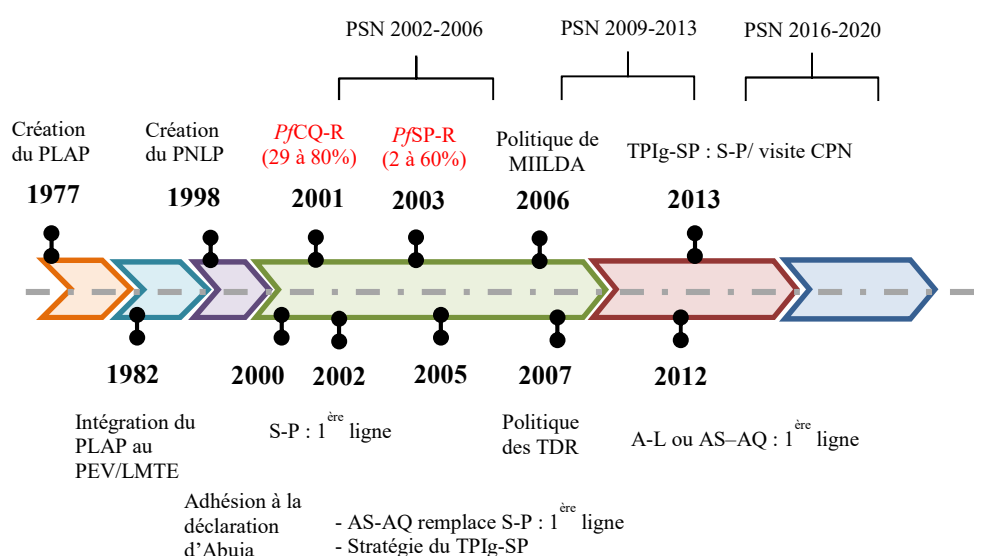


Figure 1.2. Historique de la politique antipaludique en RDC*.

(*) PLAP : Projet de Lutte Anti Paludique ; PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ; PEV/LMTE : Programme Elargi de Vaccination et de Lutte contre les Maladies Transmissibles de l'Enfance ; P/CQ-R : Résistance de *P. falciparum* à la chloroquine ; P/SP-R : Résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine ; MIILDA : moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action ; AS-AQ: Astésunate-

amodiaquine; TPIg-SP: Traitement préventif intermittent à base de la sulfadocine-pyriméthamine ; PSN : Plan Stratégique National.

A peine deux ans après l'adoption de S-P dans le traitement curatif de première ligne, l'émergence de la pharmacorésistance avait dû imposer le changement de la politique en faveur des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). En l'occurrence, l'association artésunate - amodiaquine (AS-AQ) fut adoptée en mars 2005 pour le traitement du paludisme non compliqué et la quinine gardée pour la prise en charge du paludisme grave [25]. En même temps, la stratégie du traitement intermittent à base de la S-P pendant la grossesse (TPIg-SP) a été mise en œuvre avec adoption, en 2006, de la politique de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), devenant les deux axes prioritaires pour la prévention du paludisme [4, 34]. En 2007, le PNLP introduit l'utilisation du TDR du paludisme comme moyen diagnostic. Et, suite à la fréquence élevée des effets secondaires liés à l'AS-AQ, en 2012, le PNLP dans son PSN 2009-2013 recommande la combinaison artémether-luméfantine (A-L) comme une alternative à l'AS-AQ [4, 34, 37].

1.3. Organisation de la lutte antipaludique en RDC

La lutte antipaludique en RDC est hiérarchisée et organisée selon l'ossature générale du système de santé national. En effet, le système de santé congolais a une structure pyramidale avec trois niveaux : central, intermédiaire et périphérique (**Figure 1.3**). Le niveau central est destiné à la prise de décisions politiques ; il comprend, le bureau du ministre de la santé, le secrétaire général et les directions des programmes nationaux spécifiques aux maladies. Le niveau intermédiaire (provincial) assure les fonctions d'appui technique et de suivi, et comprend 26 divisions provinciales de la santé. Le niveau périphérique comprend 516 zones de santé (ZS), qui constituent le dernier maillon de la chaîne sanitaire où sont mis en œuvre tous les paquets d'interventions, y compris ceux liés à la lutte contre le

paludisme [23, 38]. Les ZS fonctionnent comme des entités décentralisées autonomes avec leur propre gestion. Une ZS comprend un hôpital général de référence (HGR) et un réseau de centres de santé (CS), et couvre une population moyenne de 150 000 habitants en régions rurales et de 250 000 en régions urbaines. Les 516 zones de santé sont divisées en 8504 aires de santé. Chaque aire de santé dessert entre 5000 et 10000 personnes. Le système de santé comprend également des agents de santé communautaires qui fournissent des traitements au niveau communautaire dans le cadre de la gestion communautaire intégrée des cas [25, 38].

A l'instar du système sanitaire, le PNLP en RDC qui émane de la 4^{ème} Direction du Ministère de la Santé Publique est structuré en 3 niveaux (**Figure 1.3**). Le niveau central, structure d'élaboration des normes et stratégies, est composé d'une Direction Nationale du PNLP et de huit Divisions Techniques (Partenariat, Prévention Multiple, Surveillance épidémiologique, Suivi et Evaluation, Communication, Recherche opérationnelle, Administration et Finances, et Prise en charge). Ensuite, le niveau intermédiaire, relevant de la Division Provinciale de la Santé, est doté d'un service provincial de lutte contre le paludisme appelé à coordonner techniquement le secteur de la lutte antipaludique et géré par le Coordonnateur Provincial, sous l'autorité du Chef de Division. Enfin, vient le niveau périphérique qui assure la mise en œuvre de la politique antipaludique nationale au contact de la communauté. Ce niveau s'appuie sur chacune des 516 ZS et ses établissements de soins qui sont chargés d'appliquer les directives nationales sur le paludisme en matière de surveillance en routine, de prévention, de diagnostic et de traitement médicamenteux des cas [23, 25]. De toutes les ZS, 26 situées dans chacune des provinces du pays, sont érigées en sites sentinelles pour la surveillance de l'efficacité des stratégies de contrôle (**Tableau 1.1**) [19, 25, 33]. Chaque site sentinelle comprend un HGR et un réseau de structures sanitaires publiques et privées sous la supervision de la ZS locale.

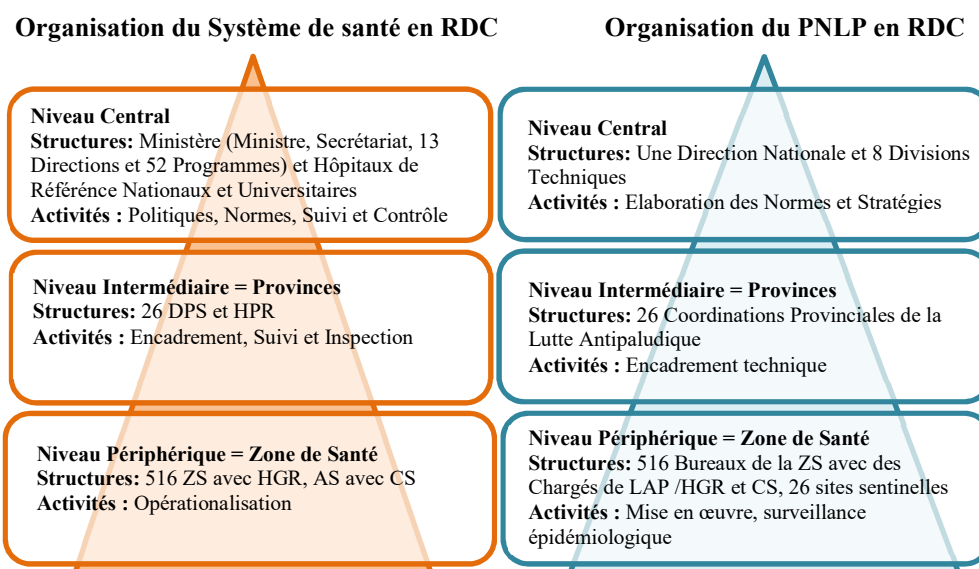


Figure 1.3. Organisation de la lutte antipaludique en RDC par le PNLN*.

(*) PNLN : Programme National de lutte contre le Paludisme, DPS : Divisions Provinciales de la Santé, ZS : Zone de Santé, HPR : Hôpitaux Provinciaux de Référence, HGR : Hôpital Général de Référence, AS : Aire de Santé, CS : Centre de santé, LAP : Lutte antipaludique

1.4. Les stratégies de la lutte antipaludique en RDC

Les principales stratégies nationales de lutte antipaludique sont définies dans le PSN de lutte contre le paludisme qui est continuellement mis à jour à la lumière des recommandations de l'OMS, du plan stratégique mondial FRP et des résultats émanant des études conduites localement [13, 23, 25, 35, 36]. Les stratégies clés actuellement se résument comme suit :

Stratégie 1 – Le renforcement de la prévention du paludisme en mettant l'accent sur la protection individuelle et collective grâce aux MILDA, à la pulvérisation intradomiciliaire (PID), au traitement des sites de reproduction des moustiques et à la prévention du paludisme pendant la grossesse grâce au TPIg-SP [23]. Les MILDA sont distribuées par le biais de campagnes de distribution de masse

gratuites et de façon systématique au cours des consultations prénatales (CPN) et préscolaires (CPS). Les activités de PID ne sont entreprises que par la société minière Tenke-Fungurume dans la Province du Lualaba. Le TPIg-SP consiste à administrer une dose unique de S-P à chaque visite de CPN à partir de la 16^{ème} semaine d'aménorrhée. En 2014, seulement 14% des femmes enceintes avaient reçu au moins 2 doses de S-P en guise de TPIg, mais ce chiffre a augmenté par la suite pour atteindre 68 % en 2018 [19, 20, 34, 35].

Tableau 1.1 : Les sites sentinelles pour la surveillance des stratégies antipaludiques du PNLN en RDC

N°	Division Provinciale de la Santé	Site sentinelle
1	Congo central	Kimpese
2	Kinshasa	Kingasani
3	Kwango	Kenge
4	Kwilu	Vanga
5	Mai-Ndombe	Inongo
6	Equateur	Bolenge
7	Sud Ubangi	Gemena
8	Nord Ubangi	Karawa
9	Mongala	Lisala
10	Tshuapa	Boende
11	Kasaï	Mweka
12	Sankuru	Lodja
13	Kasaï-Central	Mikalayi
14	Kasaï-Oriental	Dibindi
15	Tshopo	Kabondo
16	Nord-Kivu	Rutshuru
17	Sud-Kivu	Katana
18	Tanganika	Kalemie
19	Bas-Uélé	Buta
20	Maniema	Kalima
21	Lomami	Mwene-Ditu
22	Lualaba	Fungurume
23	Haut-Lomami	Kamina
24	Haut-Uélé	Pawa
25	Ituri	Nyakunde
26	Haut-Katanga	Kapolowe

Stratégie 2 – L’amélioration de la prise en charge des cas en favorisant la confirmation du diagnostic du paludisme et un traitement précoce, rapide et approprié à tous les niveaux du système de santé. La confirmation parasitologique est recommandée pour tous les cas suspects de paludisme observés à tous les niveaux du système de santé en utilisant le TDR ou la microscopie. Les combinaisons A-L et AS-AQ sont recommandées pour le traitement du paludisme non compliqué. L’artésunate injectable est recommandé pour tous les cas de paludisme grave, l’artésunate rectal pour le traitement de pré-référence au niveau communautaire et la quinine associée à la clindamycine pour le traitement des échecs thérapeutiques [19, 34, 39].

Stratégie 3 – L’amélioration de la surveillance épidémiologique et le renforcement des efforts de suivi et d’évaluation, par la Surveillance des Maladies Intégrée et Riposte réalisée sous la coordination de la Direction de Lutte contre la Maladie, la Surveillance FRP à travers les sites sentinelles du PNLP, la Surveillance « Soins de Santé Primaire » via le Système National d’Information Sanitaire (SNIS) implémenté dans les Formations Sanitaires et la Surveillance par des enquêtes ponctuelles pour s’assurer de la qualité des antipaludiques, de l’efficacité des antipaludiques, de la résistance aux insecticides [13]. Les indicateurs mis sous surveillance au sein du PNLP en RDC sont repartis en indicateurs de prévention, de la prise en charge et d’impact (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2. Indicateurs de surveillance de lutte contre le paludisme en RDC

Indicateurs de prévention
• Proportion des ménages ayant dormi sous une MILDA la nuit précédente • Proportion d'enfants de moins de 5 ans qui dorment sous une MILDA • Proportion des femmes enceintes qui dorment sous une MILDA • Proportion des femmes enceintes fréquentant la CPN • Proportion des femmes enceintes sous TPIg-SP 2 • Proportion des femmes enceintes sous TPIg-SP 3
Indicateurs de prise en charge
• Proportion des mères connaissant au moins 2 signes de danger • Nombre de cas diagnostiqués (TDR, GE) • Proportion d'enfant de moins de 5 ans avec fièvre pris en charge correctement dans les 24 h • Proportion d'enfants de moins de 5 ans atteints du paludisme simple pris en charge correctement • Proportion d'enfants de moins 5 ans avec paludisme grave pris en charge correctement • Proportion de CS sans rupture en antipaludiques • Proportion du paludisme en consultations externes • Nombre de cas de paludisme traités avec des CTA • Nombre de cas de paludisme traités avec Artésunate rectal en pré-référence • Nombre de cas de paludisme traités avec Artésunate injectable
Indicateurs d'impact
• Incidence du paludisme • Morbidité proportionnelle • Mortalité proportionnelle • Mortalité du paludisme • Mortalité due au paludisme, chez les enfants de moins de 5 ans • Létalité hospitalière palustre • Proportion d'épidémies détectées et contrôlées conformément aux directives nationales

1.5. Le financement des activités de lutte antipaludique en RDC

Les activités de lutte antipaludique en RDC reposent essentiellement sur un financement externe [13, 35, 36]. Plusieurs partenaires multilatéraux contribuent aux efforts de lutte contre cette pandémie, dont les plus importants sont le Fonds Mondial International (FMI), la Banque Mondiale, l'Initiative du Président Américain contre le paludisme (USAID/PMI) et le Département Britannique du

Développement International (DfID). Parmi les autres partenaires figurent le Fond International d'Urgence des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF), l'Agence Coréenne de Coopération Internationale (KOICA), l'Agence Suédoise de Développement International et l'Agence Canadienne de Développement International. Chaque donateur couvre un certain nombre de zones prioritaires. Actuellement, le soutien des partenaires aux 516 ZS est restructuré en fonction des 26 nouvelles provinces, un partenaire donné couvrant entièrement une province donnée [13, 34, 35]. Avec le soutien de ses partenaires, le PNLP a intensifié ses interventions clés au cours de la décennie écoulée, mais la charge des dépenses encourues par le ménage pour les soins antipaludiques continue à être élevée et nécessite davantage d'efforts pour l'effectivité d'un accès universel aux services de prévention, de diagnostic et de traitement du paludisme dans différents établissements de santé du pays [21, 35, 40].

CHAPITRE 2. GENERALITES SUR LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES ET SES IMPLICATIONS EN SANTE PUBLIQUE

2.1. Définition des concepts

- 1- **La résistance des parasites du *Plasmodium* aux antipaludiques.** Elle avait été initialement définie comme étant «la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament à des doses égales ou supérieures à celles recommandées mais restant dans les limites de la tolérance du sujet» [8, 41, 42]. Cette définition a été modifiée par la suite pour préciser que le médicament en question doit «accéder au parasite ou au globule rouge infecté pendant la durée nécessaire à son action normale» [43]. Ceci suppose la démonstration de la parasitémie du paludisme chez le patient ayant reçu une dose donnée d'un médicament antipaludique et la démonstration simultanée de concentrations sanguines adéquates du médicament et ses métabolites en utilisant des méthodes de laboratoire établies [1]. En pratique, les conditions de cette définition sont rarement remplies par les études *in vivo* qui se soustraient souvent de cette confirmation de l'absorption et du métabolisme des médicaments [1, 41]. Avec l'apport de la biologie moléculaire, la résistance des parasites du paludisme aux médicaments est actuellement conçue comme la résultante de modifications génétiques survenant aléatoirement dans la population parasitaire et qui confèrent une sensibilité réduite à un médicament donné ou à une classe de médicaments sans être délétères aux parasites [8].
- 2- **La multi-résistance des parasites aux antipaludiques.** C'est une résistance d'isolats de *Plasmodium* vis-à-vis de plus de deux composés antipaludiques de classes chimiques différentes. Ce terme fait généralement référence à la

résistance de *P. falciparum* à la CQ, à la S-P et à un troisième composé antipaludique [44].

3- L'échec clinique du traitement antipaludique. Une distinction doit être faite entre une incapacité à éliminer la parasitémie palustre ou à résoudre une maladie clinique après un traitement à base d'un antipaludique et une véritable résistance aux antipaludiques. En effet, si la pharmaco-résistance peut entraîner l'échec du traitement, les échecs thérapeutiques ne sont pas tous dus à la résistance aux médicaments. De nombreux facteurs peuvent contribuer à l'échec du traitement, notamment une parasitémie récurrente dans les pays d'endémie palustre, le non-respect de la durée du schéma posologique, la contrefaçon et les antipaludiques de mauvaise qualité, le statut immunitaire de l'hôte, des interactions médicamenteuses ou une absorption médiocre [1, 8, 42, 45-48]. Il est probable que tous ces facteurs, tout en provoquant un échec du traitement (ou un échec apparent du traitement) chez l'individu, peuvent également contribuer à l'émergence et au développement d'une véritable résistance aux médicaments en augmentant l'exposition des parasites à des niveaux infra-thérapeutiques des médicaments [8].

2.2. Historique et épidémiologie de la résistance aux médicaments antipaludiques

Pendant des siècles, le paludisme et les fièvres intermittentes ont été traités avec des préparations issues de la pharmacopée traditionnelle telles que les infusions de qinghaosu (*Artemisia annua*) ou de quinquina (*Cinchona calisaya*) [49]. Etant donné les capacités biologiques exceptionnelles du *Plasmodium*, l'émergence de la résistance aux antipaludiques pourrait être tout au moins aussi vieille que l'utilisation de ces préparations médicinales. Mais c'est plutôt la détection et la reconnaissance de cette résistance par le monde médical qui sont relativement

récentes, schématisées dans la **Figure 2.1**. Ainsi, les premiers cas de résistance à la quinine (QN), le plus ancien membre de l'arsenal antipaludique dans le monde occidental, ont été documentés depuis 1908 chez les travailleurs des chemins de fer allemands revenant de la frontière entre le Brésil et la Bolivie ; mais ces cas restent actuellement sporadiques [50]. Développée vers les années 1940, la CQ s'était rapidement imposée comme l'antipaludique le plus largement utilisé dans le monde. Toutefois, moins de vingt ans après son adoption internationale, les parasites chloroquino-résistants ont rapidement émergé en particulier dans les pays ayant soumis les populations à des traitements de masse comme la Colombie, la Thaïlande et le Cambodge [51, 52]. Vers les années 1970, la résistance à la CQ atteignait l'Afrique de l'Est [53-56]. Et en peu de temps, la CQ était devenue inefficace pour le traitement du paludisme, imposant la nécessité des traitements alternatifs [57]. Cette situation eut un tel impact épidémiologique que, faute de médicaments efficaces rapidement rendus disponibles, le taux de mortalité lié au paludisme avait augmenté à un rythme alarmant, notamment en Afrique où ce taux pouvait être multiplié par six chez les enfants de moins de dix ans dans certains pays [58]. Une des solutions proposées dès 1967 face à cette montée de la résistance à la CQ avait été l'utilisation d'une thérapie combinée à base de S-P [57]. Mais il aura fallu juste deux décennies seulement après l'introduction de la combinaison S-P, pour signaler les premiers cas de résistance du fait des résistances préexistantes aux monothérapies à base de ses constituants, la pyriméthamine (P) et la sulfadoxine (S), signalées depuis les années 1950 [59, 60]. L'utilisation répandue de la S-P aboutit à l'émergence des parasites de *P. falciparum* et *P. vivax* dotés d'une résistance importante, y compris des souches dites super-résistantes à la combinaison thérapeutique [61]. Il y a 15 à 20 ans, le TPIg-SP a été introduit dans le but principal d'améliorer l'impact du paludisme sur la naissance et la grossesse [61, 62]. Des inquiétudes ont immédiatement surgi au sujet de la propagation du paludisme résistant à la S-P et de l'effet de la résistance sur l'efficacité de la combinaison pour le traitement et la prévention du paludisme

[62]. En conséquence, en dépit de l'arrêt répandu de l'utilisation de la combinaison dans le traitement curatif de première intention, les parasites résistants de *P. falciparum* ou *P. vivax* ont poursuivi leur propagation et continué à susciter des inquiétudes y compris dans les régions où la S-P avait pu être adoptée en association avec l'artésunate (AS) dans le cadre des CTA [63-65].

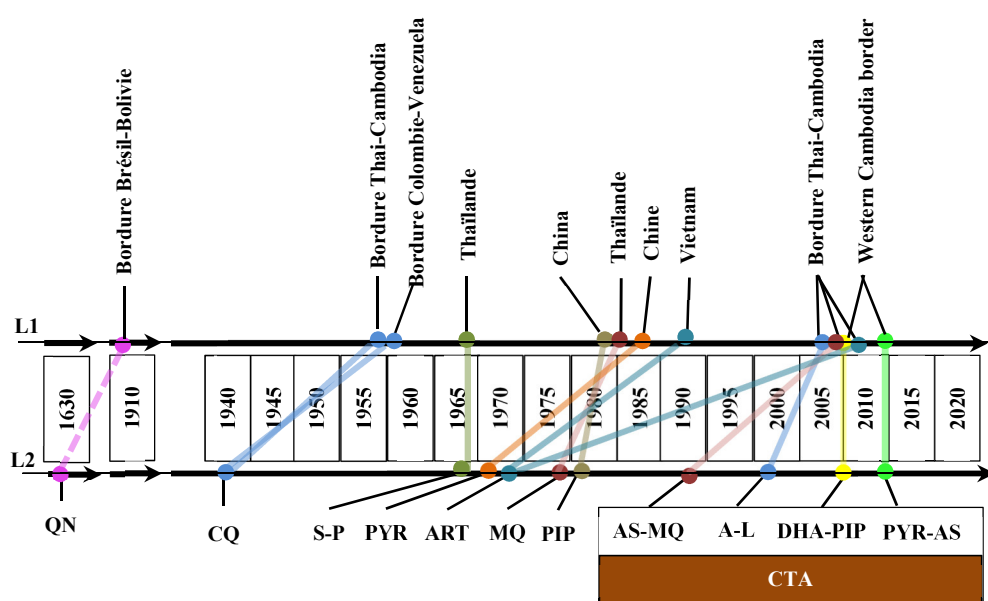


Figure 2.1. Historique de l'émergence de la résistance aux différents antipaludiques dans le monde *.

(*) QN : Quinine ; CQ : Chloroquine ; S-P : Combinaison sulfadoxine-pyriméthamine ; ART : Artémisinine ; MQ : Méfloquine ; PIP : Pipéraquline ; AS-MQ : Combinaison artésunate-méfloquine ; A-L : Combinaison artémether-luméfantrine ; DHA-PIP : Combinaison dihydroartémisinine-pipéraquline ; PYR-AS : Combinaison pyronaridine-artésunate ; L1 : Apparition de la 1ère résistance ; L2 : Généralisation du médicament

Développée à l'origine en Chine pour remplacer la S-P dans les années 1970, l'artémisinine (ART) avait été présentée comme le « médicament miracle » en raison de son efficacité rapide au cours du traitement curatif du paludisme en première intention [66, 67]. Plus tard, lorsqu'elle était associée à des médicaments

partenaires à action plus lente et aptes à éliminer les parasites retardataires, les dérivés de l'ART tels que l'artéméter (ATM), l'artésunate (AS) et la dihydroartémisinine (DHA) étaient devenus imparables. Au début des années 2000, les CTA étaient devenues le traitement de référence contre le paludisme [67]. Ces médicaments ont permis d'abord de ralentir les taux de mortalité à l'échelle mondiale, puis de les réduire sensiblement par centaines de milliers des cas. Toutefois, la menace des résistances n'était pas totalement écartée : certains des médicaments partenaires de l'ART au sein des CTA existaient déjà depuis des décennies en tant qu'alternatives à la CQ et contre lesquels diverses souches de *P. falciparum* avaient déjà pu développer une résistance. C'est le cas de la méfloquine (MQ), un médicament existant depuis la fin des années 1970, qui était utilisée vers 1990 sous forme d'AS-MQ à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande où des thérapies pré-existantes à base de la MQ échouaient déjà [68, 69]. De même, la combinaison entre la DHA avec un médicament existant, la pipéraquine (PIP), est arrivée sur le marché en 2007 mais a rapidement échoué contre les souches résistantes à la PIP [68, 70, 71]. Plus récemment, en plus de la résistance aux médicaments partenaires des CTA, des souches cliniques de *P. falciparum* ont également démontré des signes d'évasion à l'activité même des dérivés de l'ART. Des chercheurs du Cambodge ont rapporté un retard de clairance parasitaire, au-delà de trois jours après traitement aux dérivés de l'ART [72]. Ce phénotype a été qualifié de résistance « partielle » ou « émergente » à l'ART car le traitement permettait encore d'éliminer la plupart des parasites en une semaine [71]. Au cours de la dernière décennie, la région d'Asie du Sud-Est infestée par des parasites du paludisme exhibant ce phénotype n'a cessé de s'étendre malgré les efforts de contention de cette expansion. La menace de l'exportation de cette résistance vers l'Afrique est apparue vite comme une véritable épée de Damoclès suspendue sur la lutte antipaludique dans le monde [14].

Tableau 2.1. Distribution spatiale de la pharmaco-résistance du *Plasmodium* dans le monde [7, 14, 73-76]

Médicament	Distribution spatiale des cas de résistance rapportés
Quinine (QN)	Cas sporadiques mondiaux (surtout en Asie du Sud-Est)
Luméfantrine (L)	Cas sporadiques en Asie du Sud-Est
Méfloquine (MQ)	Asie du Sud-Est, cas sporadiques en Afrique, Amérique du Sud et Inde
Chloroquine (CQ)	Dans le monde entier
Amodiaquine (AQ)	Amérique du Sud, Asie, Afrique de l'Est
Pipéraquine (PIP)	Emergence rapide en Asie du Sud-Est
Primaquine (PR)	Nulle part
Sulfadoxine (S)	Dans le monde entier
Pyriméthamine (P)	Dans le monde entier
Atovaquone (AT)	Cas sporadiques mondiaux
Proguanil (PRO)	Cas sporadiques mondiaux
Artémisinine (ART) & dérivés	Etablie en Asie du Sud-Est, en émergence en Afrique de l'Est et en Amérique du Sud

A ce jour, de différentes espèces plasmodiales infectant l'homme, seuls *P. falciparum* et, dans une moindre mesure, *P. vivax* ont été trouvés capables de développer la résistance aux molécules antipaludiques en vigueur [1]. En effet, la pharmaco-résistance à presque tous les médicaments de l'arsenal antipaludique a été décrite pour le *P. falciparum* et vis-à-vis de la CQ et la S-P, pour le *P. vivax*. Les autres espèces plasmodiales sont restées peu étudiées. Grace aux avancées techniques réalisées dans la détection de la résistance et à la gamme quelque peu diverse des molécules antipaludiques en usage, la situation épidémiologique actuelle est différente de celle ayant prévalu à l'époque de l'expansion de la résistance à la CQ (**Tableau 2.1**).

Dans l'ensemble, partout où ils ont été évalués, les traitements de première et de deuxième lignes restent efficaces contre le paludisme [1]. Dans les régions où des taux élevés d'échecs thérapeutiques liés à une importante résistance de *P. falciparum* à l'ART ont été signalés, des changements de politique ont été apportés ou sont en cours. Il s'agit notamment de quatre pays de la Sous-région du Grand Mekong (SGM) – Cambodge, République Démocratique Populaire du Laos,

Thaïlande et Viet Nam – où des taux élevés d'échecs thérapeutiques sont détectés après traitement par certaines CTA [1, 7]. La situation la plus problématique actuellement dans cette sous-région est l'augmentation très rapide des taux d'échec vis-à-vis de DHA-PIP, qui a été le traitement de première intention et la CTA préférée dans la plupart des pays d'Asie du Sud-Est [76, 77]. Cependant, il existe encore au moins deux et parfois trois CTA disponibles qui peuvent traiter efficacement le paludisme dans ces pays [1]. Les combinaisons d'A-L et d'AS-AQ sont les politiques de traitement de première intention dans la plupart des pays africains, certains pays ajoutant l'association DHA-PIP [78]. Des échecs thérapeutiques après un traitement par A-L ont été rapportés chez des voyageurs revenant d'Afrique vers l'Europe ou l'Asie, mais la résistance à la luméfantrine (L) n'a pas été confirmée en Afrique [78-80]. En dehors de la SGM, la découverte dans quelques pays en Afrique (ex. Rwanda, Ouganda, Malawi, Kenya) et en Amérique Latine (ex. Guyane) de mutations du gène codant pour la protéine Kelch13 du *P. falciparum* (*PfK13*) attribuées à la résistance à l'ART soulèvent actuellement de vives inquiétudes [14, 73, 81-83]. Ces observations viennent ainsi confirmer l'émergence effective de la résistance à l'ART en Afrique, renforçant la nécessité urgente de surveiller et mettre en place des mécanismes de contention contre les parasites résistants à l'ART.

2.3. Mécanismes fondamentaux de résistance aux antipaludiques

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance sont actuellement décrits pour la plupart des molécules antipaludiques, notamment dans l'espèce *P. falciparum* (et dans le *P. vivax* uniquement pour la CQ et les anti-folates) (**Tableau 2.2**) [7, 84]. Les isolats parasitaires ayant acquis la capacité de survivre en présence d'un médicament antipaludique sont porteurs d'un trait génétique leur conférant un avantage de survie lorsque la population parasitaire est exposée audit médicament [8]. Ce trait génétique lié à la résistance médicamenteuse peut être

identifiable par les techniques modernes de biologie moléculaire et peut servir ainsi de marqueur moléculaire de la résistance (MMR). Dépendamment du type de médicament antipaludique et de son mode d'action, les traits génétiques nécessaires pour générer la résistance aux médicaments antipaludiques peuvent se présenter sous la forme d'une mutation ponctuelle, des mutations cumulées par un ou plusieurs gènes indépendants ou encore sous la forme d'une amplification d'un gène en plusieurs copies sur le génome du parasite (**Tableau 2.2**).

Fondamentalement, le *Plasmodium* extrait de l'hémoglobine les protéines nécessaires à la fabrication des protéines parasitaires après endocytose et digestion vacuolaire de celle-ci. De cette digestion se libère l'hème, potentiellement toxique pour le parasite. Normalement, le parasite polymérise les sous-unités de l'hème en cristaux inoffensifs d'un pigment parasite, l'hémozoïne, afin de se détoker. La plupart des modifications génétiques mises en cause dans la résistance interfèrent avec des étapes de ce processus allant de l'endocytose de l'hémoglobine à sa digestion vacuolaire, ciblées par différents antipaludiques (ex. QN, CQ, AQ, MQ, L, PIP, ART et dérivés). Certaines de ces résistances (ex. ART et dérivés) semblent aussi impliquer d'autres mécanismes plus complexes ayant trait à d'autres voies métaboliques du parasite. Il y a également la résistance qui résulte de modifications génétiques qui préviennent l'interférence dans la synthèse de l'ADN parasite par le médicament (ex. S, P, PRO) ou dans la chaîne respiratoire du parasite (ex. AT). Mais le mécanisme de la résistance à quelques antipaludiques reste encore non élucidé (ex. PR) [7, 84-86].

2.4. Méthodes de surveillance de la résistance aux antipaludiques

Il existe trois approches différentes pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques : (1) les essais *in vivo* ou tests d'efficacité thérapeutique ; (2) les essais de sensibilité *in vitro/ex vivo*, (3) et la détection des marqueurs moléculaires

de la résistance. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des limites propres (**Tableau 2.3**).

Tableau 2.2. Mécanismes fondamentaux de la résistance aux antipaludiques [7, 84-86]

Amino-alcools	
<i>Quinine (QN)</i>	
Utilisation majeure	: Traitement des cas de paludisme grave, des cas de retraitement ainsi que ceux atteints du paludisme non compliqué à <i>P. falciparum</i> au cours du premier trimestre de la grossesse
Temps de demi-vie	: 3-36 h
Mode d'action	: La QN est active contre les larges anneaux et les trophozoïtes en inhibant la détoxification de l'hème intra-parasitaire dans la vacuole digestive du parasite. Elle est également active contre les gamétocytes de différentes espèces plasmodiales à l'exception de <i>P. falciparum</i> ,
Mécanisme de résistance	: Non encore élucidé, impliquant probablement les gènes de <i>PfCRT</i> , de <i>PvCRT</i> , de <i>PfMDR1</i> ou 2, et de <i>PfNHE1</i>
<i>Luméfantrine (L)</i>	
Utilisation majeure	: Médicament partenaire dans les ACT (A-L)
Temps de demi-vie	: 2-11 jours
Mode d'action	: La molécule est active en inhibant la détoxification de l'hème dans la vacuole digestive du parasite et l'endocytose dans le cytosol parasitaire
Mécanisme de résistance	: La résistance possible par des mutations du gène de <i>PfMDR1</i> (notamment dans un contexte d'allèle CVIET sur <i>PfCRT</i>)
<i>Méfloquine (MQ)</i>	
Utilisation majeure	: Médicament partenaire dans les ACT (AS-MQ) et prophylaxie (Lariam TM et génériques)
Temps de demi-vie	: 8-15 jours
Mode d'action	: La MQ agirait en bloquant une cible plasmétique probablement située sur le ribosome parasitaire
Mécanisme de résistance	: La résistance à la MQ résulterait d'une régulation à la hausse du gène du <i>PfMDR1</i> ou 2 causée par une amplification du nombre des copies du gène. Il en

découlerait une altération du transport trans-membranaire du médicament en pompant probablement le médicament vers la vacuole digestive pour être détruit, loin de sa cible cytosolique.

4-aminoquinoléines

Chloroquine (CQ)

- Utilisation majeure : Traitement du paludisme autre que *P. falciparum*
- Temps de demi-vie : 5-12 jours
- Mode d'action : La CQ est active en inhibant la détoxification intra-parasitaire de l'hème dans la vacuole digestive du parasite. Elle pourrait également agir sur la biosynthèse des acides nucléiques.
- Mécanisme de résistance : Efflux excessif de la CQ des vacuoles digestives du parasite et réduction de la concentration intra-vacuolaire de la CQ sous le seuil d'inhibition de la polymérisation de l'hème par le parasite. Ce mécanisme est lié à des mutations ponctuelles du gène codant le *PfCRT*. Il est probable que des mutations ponctuelles du gène du *PfMDR1* soient aussi impliquées.

Amodiaquine (AQ)

- Utilisation majeure : Médicament partenaire dans les ACT (ASAQ)
- Temps de demi-vie : 3-12 h
- Mode d'action : L'AQ est active par accumulation dans la vacuole digestive du parasite et inhibition de la détoxification de l'hème
- Mécanisme de résistance : Similaire à celui contre la CQ, à travers l'accumulation de mutations dans le gène du *PfCRT* (sous forme d'allèle SVMNT) et probablement des mutations du gène du *PfMDR1* (dans un contexte d'allèle CVIET du *PfCRT*).

Pipéraquine (PIP)

- Utilisation majeure : Médicament partenaire dans les ACT (DHA-PIP)
- Temps de demi-vie : 13-28 jours
- Mode d'action : Non encore bien élucidé. Le médicament est actif en inhibant la détoxification intra-parasitaire de l'hème dans la vacuole digestive du parasite et probablement en ciblant également les plasmepsines 2 et 3, deux protéases dont le parasite a besoin pour l'extraction de l'hémoglobine nécessaires à la fabrication des protéines

Mécanisme de résistance	: parasites
	: Les mécanismes possibles incluent l'amplification des copies des gènes des plasmepsines 2 et 3 (<i>PfPM2</i> et <i>PfPM3</i>), des mutations ponctuelles de <i>PfCRT</i> , la désamplification d'une région de 82 kb du chromosome 5 (y compris le gène de <i>PfMDR1</i>) ainsi que l'amplification d'une région adjacente de 63 kb du chromosome 5.

8-aminoquinolésines

Primaquine (PR)

Utilisation majeure	: Traitement radical et prophylaxie terminale du <i>P. vivax</i> et <i>P. ovale</i> ; médicament gamétocytocide du <i>P. falciparum</i>
Temps de demi-vie	: 4-9 h
Mode d'action	: Activité par perturbation des processus métaboliques des mitochondries de <i>Plasmodium</i> et par interférence avec la fonction de l'ubiquinone en tant que transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire et en produisant des métabolites hautement réactifs générant des potentiels oxydants intracellulaires toxiques.
Mécanisme de résistance	: Non encore observée et décrite

Les antifolates

Sulfadoxine (S)

Utilisation majeure	: Combinaison S-P utilisée principalement pour le traitement préventif intermittent
Temps de demi-vie	: 4-11 jours
Mode d'action	: Activité par inhibition de l'enzyme dihydroptéroate synthase (DHPS), un composant de la voie de biosynthèse du folate et la réplication de l'ADN du parasite
Mécanisme de résistance	: Mutations isolées et accumulées de <i>PfDHPS</i> et <i>PvDHPS</i>

Pyriméthamine (P)

Utilisation majeure	: Combinaison S-P utilisée principalement pour le traitement préventif intermittent
Temps de demi-vie	: 2-19 jours
Mode d'action	: Actif en inhibant l'activité bifonctionnelle du

	dihydrofolate réductase – thymidylate synthase, bloquant la synthèse de pyrimidine et la réplication de l'ADN du parasite
Mécanisme de résistance	: Mutations ponctuelles et accumulées sur <i>Pf</i> DHFR et <i>Pv</i> DHFR

Naftoquinones

Atovaquone (AT)

Utilisation majeure	: Utilisé en association avec le proguanil, (AT-PRO) (Malarone™ et générique)
Temps de demi-vie	: 1-6 jours
Mode d'action	: Activité par inhibition du transport de plusieurs enzymes parasitaires et par interférence avec le système de transport des électrons du cytochrome, entraînant l'effondrement du potentiel membranaire mitochondrial
Mécanisme de résistance	: La résistance est conférée par des mutations ponctuelles dans le gène du cytochrome-b (bc1).

Biguanides

Proguanil (PRO)

Utilisation majeure	: Utilisé en association avec atovaquone (AT-PRO)
Temps de demi-vie	: 8-18 h
Mode d'action	: Activité via son métabolite actif, la triazine (cycloguanil), en inhibant la dihydrofolate réductase bifonctionnelle – activité thymidylate synthase, bloquant la synthèse de la pyrimidine et la réplication de l'ADN du parasite
Mécanisme de résistance	: Mutations ponctuelles sur le gène de <i>Pf</i> DHFR

Endoperoxydes

Artémisinines (ART) et ses dérivés : artésunate (AS), artéméther (ATM), dihydroartémisinine (DHA)

Utilisation majeure	: Traitement de première intention dans le cadre des ACT ; AS par voie intraveineuse comme étalon d'or pour traiter le paludisme grave
Temps de demi-vie	: 0,5-2,0 h (AS, DHA) ; 5,0-7,0 h (ATM)
Mode d'action	: Inhibition de l'endocytose de l'hémoglobine dans le

cytosol parasitaire. D'autres mécanismes pléiotropes déclenchant la réponse au stress du parasite via les alkylates et hème oxydé, protéines multiples et lipides, sont aussi possibles. L'activité s'exerce contre les parasites au stade sanguin, des stades annulaires aux schizontes précoces ainsi qu'aux jeunes gamétocytes, impliquant la génération des réactifs intermédiaires à médiation cationique et la réduction du pont peroxyde.

Mécanisme de résistance : Mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les protéines suivantes : *PfK13* et protéines apparentées, ainsi que *PfCoronin*.

(*) *PfCRT* : la protéine "*Plasmodium falciparum* chloroquin resistance transporter"; *PfMDR1*: la protéine "*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance 1"; *PfPM2* : Plasmepsines 2 ; *PfPM3* : Plasmepsines 3; *PfDHFR*: la dihydrofolate réductase de *P. falciparum*; *PfDHPS* : la dihydroptéroase réductase de *Plasmodium falciparum* ; *PfNHE1*: la protéine échangeuse de Na^+/H^+ du *P. falciparum*; *PfCYTB* : la protéine du Cytochrome B du *P. falciparum*; *PfK13* ; bc1 : cytochrome-b de type 1 ; la protéine kelch 13 du *P. falciparum*.

Tests d'efficacité thérapeutique ou essais *in vivo*

Les essais *in vivo* ou tests d'efficacité thérapeutique (TET) sont des évaluations prospectives des réponses cliniques et parasitologiques des patients au traitement du paludisme non compliqué [41]. Ils sont conduits avec un diagnostic validé par microscopie, et utilisant un traitement de qualité garantie et une administration médicamenteuse supervisée. Les patients perdus de vue ou censurés de l'étude (par exemple, de suite d'une automédication ou d'un refus de continuer à participer) sont exclus. L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponses au traitement selon l'OMS: (1) l'échec thérapeutique précoce, (2) l'échec parasitologique tardif, (3) l'échec clinique tardif, et (4) une réponse clinique et parasitologique adéquate qui caractérise un parasite sensible [41].

Tableau 2.3. Méthodes pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques
(Adaptation de Rashad A-G et al. [11])

Caractéristique	Essais <i>in vivo</i>	Essais <i>in vitro</i> / <i>ex vivo</i>	Marqueurs moléculaires
Avantage	• Etalon d'or pour mesurer l'efficacité thérapeutique ; • Pas d'équipement spécial ou des réactifs coûteux requis ; • Guide le changement des politiques thérapeutiques ; • Existence des protocoles standardisés par l'OMS.	• Reflets de la résistance vraie ou intrinsèque des parasites ; • Absence d'influence des facteurs confondants liés à l'hôte ou à l'environnement (ex. immunité, propriétés pharmacocinétiques des médicaments) ; • Utilité pour l'exploration de nouvelles thérapies.	• Détection des résistances avant leur évidence clinique ; • Possibilité d'évaluer les molécules non encore en usage ou déjà retiré de l'usage clinique dans une population ; • Facilité et rapidité des méthodes pour la surveillance de masse (collecte, stockage, transport et analyses d'échantillons) ; • Absence d'influence des facteurs confondants liés à l'hôte ou à l'environnement (ex. immunité, propriétés pharmacocinétiques des médicaments).
Désavantage	• Facteurs confondant divers (immunité, pharmacocinétique des médicaments, parasitémie récurrente, réinfection etc.) • Difficulté de sélection d'une cohorte représentative de la population • Nécessité d'une correction des résultats sur base des génotypes	• Défaut de corrélation parfaite à la résistance <i>in vivo</i> • Expertise technique avancée • Exigence d'une main-d'œuvre intense et des conditions nécessaires à la culture • Dangerosité si dosages isotopiques • Défaut de standardisation et de reproductibilité de la méthode	• Pas toujours corrélés à des résultats <i>in vivo</i> ; • Expertise technique avancée ; • Parfois, pas de marqueurs validés ; • Défaut de standardisation de la méthode.

Pour la surveillance épidémiologique des résistances, un nombre limité de sites sentinelles, représentant toutes les strates épidémiologiques d'un pays, est suffisant pour collecter des données longitudinales cohérentes et documenter les tendances. La recommandation est de tester l'efficacité du traitement de première et de deuxième intention sur tous les sites sentinelles au moins tous les 2 ans au maximum. Dans les zones où plusieurs espèces de *Plasmodium* sont répandues

(généralement *P. falciparum* et *P. vivax*), des sites sentinelles peuvent être utilisés pour surveiller simultanément l'efficacité thérapeutique contre ces espèces. La **Figure 2.2** présente le protocole développé et standardisé par l'OMS pour l'évaluation de l'efficacité de différents médicaments antipaludiques dans l'espèce *P. falciparum* [1, 87]. Les études *in vivo* sont considérées comme l'étalon d'or pour mesurer l'efficacité des médicaments antipaludiques, et leurs résultats constituent la base principale des données utilisées par les programmes de lutte antipaludique pour prendre des décisions en matière de politique de traitement [1, 87, 88]. Les essais *in vivo* permettent la mesure de l'efficacité clinique et parasitologique des antipaludiques ainsi que la détection de changements subtils dans les résultats thérapeutiques [1]. La possibilité de conversion des réponses *in vivo* en pratique clinique immédiate est un avantage important de ces essais sur les autres méthodes [41]. Spécifiquement, les résultats des TET pour les CTA utilisées dans le traitement de *P. falciparum* permet de déterminer (**Figure 2.3**) : (1) la proportion de patients parasitémiques au jour 3, qui est actuellement l'indicateur de choix pour la surveillance de routine pour suspecter la résistance partielle à l'ART du *P. falciparum* ; (2) la proportion d'échecs thérapeutiques au jour 28 ou 42 (les jours de suivi sont déterminés en fonction de la demi-vie du médicament partenaire de la CTA). Ainsi, un changement dans la politique nationale de traitement du paludisme doit être initié si le taux d'échec total du traitement est $\geq 10\%$, tel qu'évalué par les TET. Les PNLP sont invités à adopter les médicaments antipaludiques avec un taux de guérison parasitologique supérieur à 95 % [1, 87].

La validité et l'interprétation des résultats des essais *in vivo* sont confrontés à des limites. Essentiellement, les essais *in vivo* mesurent l'efficacité thérapeutique plutôt que la résistance aux médicaments [1, 89]. Ces essais semblent être d'une simplicité trompeuse en ce qu'ils ne reflètent pas nécessairement une véritable résistance aux médicaments mais une persistance des parasites qui pourrait être due non seulement à de nouvelles infections, mais également à divers autres facteurs déjà évoqué plus haut [1, 8, 42, 45-48]. Ainsi donc, la concentration sanguine du

médicament devrait être mesurée au jour 7 pour attester son absorption correcte et pour sa corrélation avec l'échec éventuel du traitement [41]. En outre, la microscopie utilisée à cette fin, est une méthode de référence imparfaite dont les erreurs peuvent affecter les estimations d'efficacité dans les essais cliniques [1, 90].

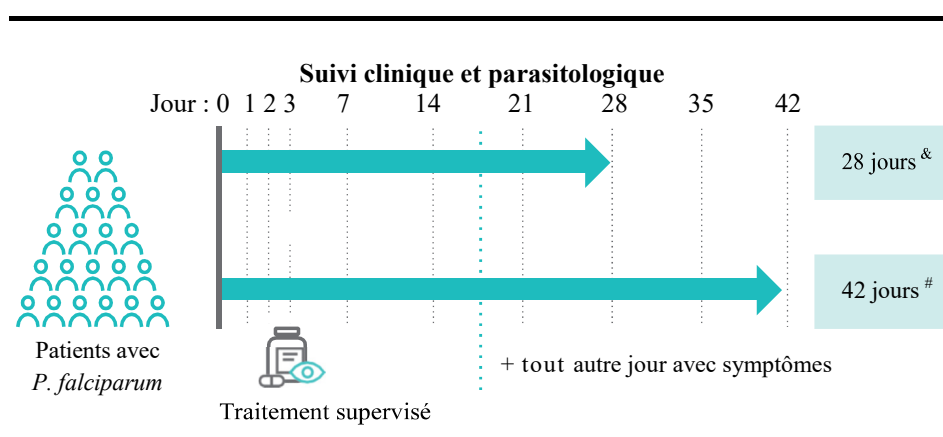


Figure 2.2. Protocole de l'OMS pour le TET de différents médicaments antipaludiques vis-à-vis de l'espèce *P. falciparum** (Adaptation de l'OMS [1]).

(*) A-L : Artésunate-Luméfantrine ; AS-AQ : Artésunate-amodiaquine ; AS+S-P : Artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine ; AS-MQ : Artésunate-méfloquine ; AS-PYR : Artésunate-pyronaridine ; DHA-PIP : Dihydroartémisinine-pipéraquine.

(&) A-L, AS-AQ, AS+S-P

(#) AS-MQ, AS-PYR, DHA-PIP)

La sélection de cohortes infectées par le paludisme non compliqué bien défini pose aussi un défi pour les études d'efficacité des médicaments *in vivo* en raison de l'hétérogénéité des patients en ce qui concerne leur âge, leur immunité, leur état nutritionnel, leur prédisposition génétique, leur fonction métabolique, etc. [91]. Par ailleurs, le génotypage moléculaire des gènes hautement polymorphes de *P. falciparum* devrait être utilisé pour faire la distinction entre les infections nouvelles et recruescentes [41]. Ce qui, toutefois, ajoute au coût cumulé des études d'efficacité thérapeutiques et reste difficile à réaliser en cas d'une multiplicité des souches infectantes et d'infections mixtes [42, 46, 92]. La réalisation d'essais d'efficacité *in vivo* nécessite une infrastructure sanitaire, un

budget et un personnel expert capable de suivre les patients et d'estimer les densités parasitaires avec exactitude et précision, ce qui peut représenter un défi dans les pays à ressources limitées [92].

Les essais *in vitro* / *ex vivo*

Les essais *in vitro* / *ex vivo* consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex vivo*), soit après adaptation en culture continue (test *in vitro*), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissante d'un antipaludique [1, 41, 46]. La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorométrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir le niveau de sensibilité intrinsèque des parasites au médicament [93, 94]. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice à 50 % (IC50), valeur correspondante à la concentration d'antipaludiques permettant d'inhiber la croissance de 50 % des parasites (par rapport à une souche parasitaire de contrôle en absence d'un antipaludique) [49, 92, 94, 95].

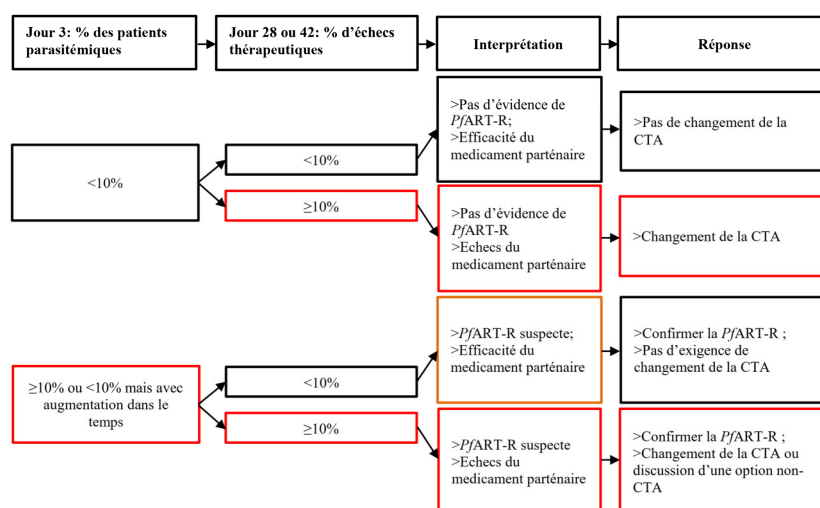


Figure 2.3. Processus de prise de décision basé sur les résultats des TET impliquant les CTA* (Adaptation de l'OMS [1, 87]).

(*) CTA : Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine ; *PfART-R* : Résistance du *P. falciparum* à l'artémisinine.

Les essais *in vitro* / *ex vivo* fourniraient une alternative plus sûre pour l'investigation initiale des candidats médicaments. En s'effectuant dans des conditions de laboratoire contrôlées, ils offrent un outil efficace pour éviter les facteurs de confusion liés à l'hôte (l'immunité) et à la cinétique du médicament lors de la mesure de la résistance du parasite aux antipaludiques. Ils donnent des résultats quantitatifs. Les résultats des tests *in vitro* peuvent compléter les résultats des études d'efficacité *in vivo* et peuvent fournir des informations utiles sur l'épidémiologie du paludisme pharmaco-résistant [1, 41]. Les essais *in vitro* pourraient également être utiles pour étudier la résistance croisée aux antipaludiques et pour établir la sensibilité de base des isolats de parasites locaux aux antipaludiques nouvellement introduits [1, 11, 41].

Toutefois, ces essais présentent un certain nombre d'inconvénients. Du fait des congélations et décongélations fréquentes et autres manipulations de laboratoire lors des cultures, ces procédés pourraient sélectionner des sous-populations de parasites génétiquement et phénotypiquement plus adaptés, distinctes et non représentatives de la population de parasites d'origine [96]. De même, les fortes densités de parasites, l'expertise technique exigée et la variabilité dans le comptage et l'évaluation des stades de développement du parasite posent un problème lors de la réalisation de ces essais [46, 49, 92, 95]. De plus, ces tests reflètent la sensibilité parasitaire moyenne de plusieurs clones présents chez un individu et peuvent ne pas détecter ceux qui résistent au médicament [97]. Les incohérences entre les réponses *in vitro* et cliniques, la faible reproductibilité des résultats et la possibilité de surestimation de la résistance sont également des limites pour la réalisation de ces essais [11, 92, 98, 99]. Par conséquent, ces tests *in vitro* sont généralement limitée à des besoins spécifiques et restent difficiles à mettre en œuvre systématiquement dans les programmes de lutte antipaludique [92, 95]. Finalement, l'utilisation de tests *in vitro* sur les espèces autres que *P. falciparum* est encore plus limitée. La préparation et le maintien d'une culture continue de *P. vivax* reste

techniquement difficile et entravé par la parasitémie généralement plus faible et la présence fréquente de plusieurs stades de développement des phases érythrocytaires asexuées et celles sexuées dans la circulation périphérique [100]. Avec ces limites, les tests *in vitro* ont ainsi joué un rôle relativement limité dans la surveillance de la résistance aux médicaments.

Néanmoins, la méthode a récemment été adaptée pour mieux simuler l'exposition *in vivo* des parasites à l'ART et ses dérivés, augmentant la corrélation entre les résultats des études *in vivo* et *in vitro*. En effet, pour imiter la réponse *in vivo* des parasites aux dérivés d'ART et augmenter la sensibilité, un essai de survie au stade d'anneaux (RSA0–3h) a été développé. Il permet de tester la réponse de parasites de stade annulaire précoce étroitement synchronisés (0 à 3 heures après l'invasion) à des niveaux pharmacologiquement pertinents pour le dérivé d'ART utilisé [1]. Des essais *in vitro* ont ainsi été adaptés pour évaluer la proportion de souches parasitaires viables (qui se développent en certains stades de trophozoïtes) malgré l'exposition à la DHA (RSA0-3h) ou de la PIP (PSA0-48h) en comparaison à une souche de contrôle [93, 101]. Récemment, un test de survie à l'AQ (AQSA0-48h) a également été développé [102]. Ces essais *in vitro* ont pu être utilisés pour la surveillance épidémiologique de la réponse *in vitro* des parasites au fil du temps, suite à l'introduction d'un médicament [103]. Ils se sont également avérés particulièrement utiles dans l'identification de marqueurs moléculaires pour la résistance partielle à l'ART et la résistance à la PIP [104, 105].

Marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques

Les marqueurs moléculaires de la résistance (MMR) aux antipaludiques sont des modifications génétiques identifiées comme étant associées à une modification de la sensibilité des parasites aux médicaments antipaludiques. Il s'agit d'un ensemble de facteurs génétiques impliqués dans les mécanismes moléculaires de la résistance [49].

Tableau 2.4. Les marqueurs moléculaires de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques * (Adaptation de l'OMS [1])

Drug	Marqueurs moléculaires	
	Gène ou protéine	Mutations
Amino-alcools		
QN	<i>PfMDR1</i> (reste à valider)	S1034C, N1042D et D1246Y
	<i>PfMDR2</i>	Augmentation des copies de <i>Pfmdr2</i>
	<i>PfNHE1</i> (reste à valider)	Variation ms4760 (++ répétitions DNNND en bloc)
	<i>PfCRT</i> (reste à valider)	K76T
L	<i>PfMDR1</i> (reste à valider)	N86Y, Y184F, S1034C, N1042D si contexte de <i>PfCRT</i> CVIET
MQ	<i>Pfmdr1</i>	Augmentation des copies de <i>Pfmdr1</i>
	<i>Pfmdr2</i>	Augmentation des copies de <i>Pfmdr2</i>
4-aminoquinoléines		
CQ	<i>PfCRT</i>	K76T et autres mutations possibles (C72S, M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T et R371I)
	<i>PfMDR1</i> (si + des mutations du <i>PfCRT</i>)	N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y
AQ	<i>PfMDR1</i> (reste à valider)	Mutations de <i>Pfmdr1</i> (N86Y) dans un contexte d'haplotype CVIET du <i>PfCRT</i>
	<i>PfCRT</i>	Haplotype SVMNT
PIP	<i>Pfpm2-3</i>	Augmentation du nombre des copies de <i>Pfpm2-3</i>
	<i>PfCRT</i>	Mutations confirmées <i>in vivo</i> : T93S, H97Y, F145I, I218F et C350R Mutations confirmées <i>in vitro</i> : T93S, H97Y, F145I, I218F, M343L et G353V
Antifolates		
P	<i>PfDHFR</i>	N51I, C59R, S108N et I164L
S	<i>PfDHPS</i>	S436A/F, A437G, K540E, A581G et A613T/S
Naphthoquinone		
AT	<i>PfCYTB</i>	Y268N/S/C
Biguanides		
PRO	<i>PfDHFR</i>	A16V, N51I, C59R, S108N et I164L
Base de Mannich		
PYR	Inconnu	
Endoperoxides		
ART et dérivés	<i>PfK13</i>	Mutations validées : F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, P574L, C580Y
		Mutations candidates ou associées : P441L, G449A, C469F/Y, A481V, R515K, P527H, N537I/D, G538V, V568G, R622I, A675V
		Mutations suspectées : K479I, G533A, R575K, M579I, D584V, P667T, F673I et H719N

(*) ART : Artémisinine ; PYR : Pyronaridine ; AT : Atovaquone ; PRO : Proguanil ; S : Sulfadoxine ; P : Pyméthamine ; PIP : Piperaquine ; AQ : Amodiaquine ; CQ : Chloroquine ; QN : Quinine ; MQ : Méfloquine ; L : Luméfantrine ; *PfCRT* : la protéine "*Plasmodium falciparum* chloroquin resistance transporter" ; *PfMDR1* : la protéine "*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance 1" ; *Pfpm2-3* : gènes des plasmepsines 2-3 du *P. falciparum* ; *PfDHFR* : la dihydrofolate réductase de *P. falciparum* ; *PfDHPS* : la dihydroptéroate synthase du *P. falciparum* ; *PfNHE1* : la protéine échangeuse de Na⁺/H⁺ du *P. falciparum* ; *PfCYTB* : la protéine du Cytochrome B du *P. falciparum* ; *PfK13* : la protéine kelch 13 du *P. falciparum*.

Les MMR sont associés soit à un défaut d'accumulation du médicament au niveau de l'organe cible du parasite soit à une modification de la cible parasitaire de l'agent antipaludique [49]. Pertinents et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques, ils occupent une place d'importance croissante dans la surveillance de l'activité des antipaludiques. L'intérêt croissant porté aux MMR est la résultante du concours de plusieurs circonstances récentes dont notamment le développement rapide de nouvelles techniques de séquençage et la diffusion accrue des séquences génétiques. Le **Tableau 2.4** présente les marqueurs moléculaires reconnus par l'OMS [1].

Les données générées par la détection des MMR conviennent mieux aux évaluations épidémiologiques. Ces marqueurs permettent de suivre et de cartographier l'émergence et la propagation du paludisme pharmaco-résistant [106, 107]. Les essais *in vivo* et *in vitro* ne sont pas appropriés pour les études à grande échelle des programmes nationaux de lutte antipaludique [11, 96]. Par rapport aux autres méthodes, la détection des MMR, par contre, offre la possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons à la fois et en un temps bref, avec possibilité d'évaluer conjointement plusieurs molécules antipaludiques [108]. La collecte, le stockage et le transport d'échantillons de sang pour une analyse moléculaire ultérieure sont beaucoup plus faciles que les tests *in vitro* [1, 11]. Ils aident à la détection précoce d'une résistance émergente avant que l'échec du traitement ne devienne cliniquement évident, tout en contournant les facteurs de l'hôte et de l'environnement qui interfèrent avec les résultats *in vivo* [11, 105, 107, 109]. Ils peuvent se réaliser même chez les sujets porteurs d'une très faible parasitémie et pourraient être mis à contribution dans les populations asymptomatiques, pouvant constituer le réservoir de la transmission du paludisme et de l'émergence des résistances en milieu endémique [105, 107].

À l'ère des thérapies combinées comprenant des médicaments anciens et nouveaux, les MMR peuvent discriminer le rôle individuel de chaque médicament dans la résistance [110]. Les MMR peuvent également être utiles pour déterminer la

nécessité de mesurer l'efficacité clinique des antipaludiques dans les zones où les ressources sont limitées pour mener des études *in vivo*, et peuvent donc être d'une importance capitale dans la rationalisation des moyens pour la surveillance des résistances [111].

La détermination du génotype des mutations validées dans les gènes associés à la résistance a ajouté une autre dimension aux efforts de surveillance en rendant possible des enquêtes sur les origines et le mode de propagation de la résistance aux médicaments [47]. Cependant, les résultats des traitements antipaludiques étant influencés par des facteurs autres que la sensibilité médicamenteuse intrinsèque de parasites, même les marqueurs qui sont en corrélation presque parfaite avec la résistance *in vitro* sont d'une utilité limitée pour prédire le résultat du traitement cliniques des patients à l'échelle individuelle [49]. Ce qui en limite l'utilisation en pratique clinique.

2.5. Facteurs contribuant au développement de la résistance aux antipaludiques et impact en Santé Publique

De nombreux facteurs peuvent contribuer à l'apparition, à la propagation et à l'intensification de la résistance aux médicaments antipaludiques, bien que leur contribution relative à la résistance reste inconnue. Ces facteurs comprennent ainsi des problèmes aussi disparates que le comportement humain, la biologie des vecteurs et des parasites, la pharmacocinétique, l'organisation sanitaire et l'économie des pays [8]. Ces facteurs peuvent schématiquement être regroupés en deux catégories incluant les facteurs biologiques et les facteurs programmatiques. Les facteurs biologiques contribuant à l'émergence ou à la propagation de la résistance peuvent relever de l'hôte (ex. un défaut de réponse immunitaire spécifique), du vecteur (ex. l'espèce vectorielle) ou du parasite (ex. l'espèce plasmodiale). Les programmes antipaludiques en place peuvent également contribuer au développement de la résistance aux antipaludiques en agissant à

travers la pression globale assurée sur les médicaments, des comportements thérapeutiques préconisant une prise de médicament inadéquate (mauvaise observance ou schémas posologiques inappropriés), les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments en usage ou de la combinaison de ces médicaments et les possibles interactions médicamenteuses [8]. L'émergence et la diffusion du paludisme pharmaco-résistant peut avoir des conséquences de nature clinique, épidémiologique ou même socio-économique [9]. La **Figure 2.4** résume les facteurs pour lesquels des évidences existent en faveur de leur rôle dans l'émergence et la diffusion de la résistance aux antipaludiques ainsi que leurs implications pour la santé humaine. Ces implications dépendent en grande partie des interactions complexes existant entre la chimiothérapie, la résistance aux médicaments et l'immunité de l'hôte [112]. A titre illustratif, différents degrés d'immunité entraîneront des résultats différents de la chimiothérapie. Les parasites partiellement résistants à un traitement peuvent encore être radicalement guéris grâce au soutien synergique du système immunitaire. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'émergence fréquente des parasites pharmaco-résistants dans les populations non immunisées d'Asie du Sud-Est. L'immunité des populations résidant en zones endémiques peut donc rendre l'impact d'une pharmaco-résistance naissante imperceptible.

Toutefois, lorsqu'un médicament antipaludique devient sensiblement inefficace, le traitement entraînera une biomasse parasitaire persistante qui pourrait potentialiser la transmission dans la communauté. Une morbi-mortalité supplémentaire due spécifiquement au paludisme peut en résulter même si elle reste difficile à quantifier en particulier dans les zones à forte transmission [109]. Il existe également des évidences solides que le paludisme résistant peut également influencer la mortalité toutes causes confondues [9, 113, 114]. Les implications épidémiologiques de la résistance dépendront également de l'organisation du système de santé (manque d'accès aux établissements de soins, recours aux pratiques comme l'automédication dans la communauté, etc.) [9].

La résistance aux médicaments antipaludiques représente également un défi majeur pour les services de santé, en particulier en Afrique subsaharienne. En effet, il existe un risque accru de surcharge des structures de soins en patients y compris par les cas admis pour paludisme grave ; ce qui peut compromettre sérieusement la qualité des soins dispensés par épuisement des stocks en intrants et par le travail sous tension des agents de santé [115-117]. Les besoins d'amélioration ou d'adaptation des procédures de diagnostic imposés par l'émergence et la propagation des parasites pharmaco-résistants entraîne un coût plus élevé des soins [58, 115]. La mortalité (et d'autres complications) du paludisme pourrait ainsi augmenter chez les patients gravement malades (de paludisme ou non) et admis dans les établissements de santé [118].

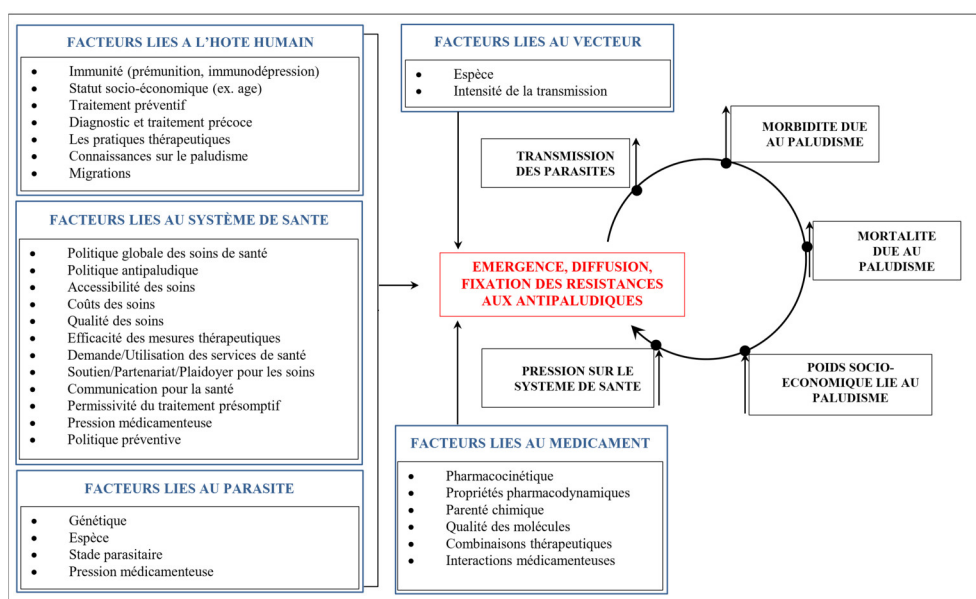


Figure 2.4. Facteurs contribuant au développement des résistances aux antipaludiques et impact de celles-ci en santé publique (schéma créé à partir de Bloland PB [8]).

2.6. Mesures de santé publique contre les résistances aux antipaludiques

Le but principal en santé publique de la lutte contre les résistances aux antipaludiques est de pérenniser l'efficacité de l'arsenal des médicaments antipaludiques disponible, jusqu'à ce que de nouveaux médicaments et outils soient disponibles [1]. Pour ce faire, des mesures de santé publique doivent être prises pour combler les lacunes dans la qualité et la couverture des interventions antipaludiques en général et, plus spécifiquement, pour minimiser le risque de résistance aux médicaments ou limiter les conséquences pour la santé publique lorsque la résistance aux médicaments apparaît et se propage. Plusieurs mesures de santé publique sont recommandées par l'OMS pour lutter contre les résistances aux antipaludiques [1, 119]. Il s'agit notamment :

- Des mesures de prévention de la résistance par la réduction de la pression médicamenteuse sur les parasites et la réduction du risque de transmission ultérieure du paludisme à partir de cas de recrudescence.
- La surveillance de l'efficacité thérapeutique des médicaments et des parasites résistants aux antipaludiques afin de suivre l'évolution de la sensibilité des parasites aux schémas thérapeutiques en vigueur et réviser en temps voulu les politiques antipaludiques.
- Les stratégies de réponse à la présence des souches résistantes considérées comme une menace potentielle pour la santé publique dans une région, dans le but de minimiser l'impact et contenir la résistance dans la zone où la résistance s'est déjà développée ; ou dans le but de réduire la transmission et (si possible) réaliser l'élimination dans les zones où la résistance est en émergence.
- Et le développement de nouveaux outils (médicaments, stratégies, méthodes diagnostiques, etc.), des connaissances pour une meilleure compréhension de la résistance et de la base de données servant de référence aux différentes activités de lutte contre les résistances. D'où la place importante de la recherche scientifique.

CHAPITRE 3. METHODOLOGIE GENERALE

3.1. Cadre d'étude de la thèse

Cette thèse a eu pour cadre d'étude la RDC qui est un pays situé en Afrique centrale et le deuxième plus grand pays d'Afrique (après l'Algérie), avec une superficie de 2.345.000 km². Le pays partage 9,165 km de frontières avec neuf pays dont la République du Congo à l'Ouest ; la République Centre Africaine et le Soudan du Sud au Nord ; l'Ouganda, le Rwanda, le Burundi et la Tanzanie à l'Est ; la Zambie au Sud-est ; l'Angola au Sud et 37 km de côte bordés par l'océan Atlantique à l'Ouest [25]. Avec une population estimée à environ 89 millions d'habitants dont la majorité vit dans les zones rurales, la RDC est le quatrième pays le plus peuplé d'Afrique (après le Nigeria, l'Éthiopie et l'Égypte) [20, 23]. La RDC est géographiquement située de part et d'autre de l'équateur, entre le 5^{ème} degré de latitude Nord et le 14^{ème} degré de latitude Sud. Elle connaît toute la gamme des climats caractéristique de la zone tropicale humide avec le climat équatorial au centre, le climat tropical et humide au Nord et au Sud, et le climat tempéré en altitude à l'Est. La pluviométrie annuelle est généralement élevée, elle varie entre 1500 et 2000 mm près de l'équateur, et entre 1400 et 1500 mm dans les zones tropicales et montagneuses. Les deux climats chauds favorisent, avec la pluviométrie importante, le développement du moustique, vecteur du paludisme et le *Plasmodium* son agent étiologique [20, 23]. Sur le plan administratif, la RDC est un État décentralisé qui compte, à la suite de la réforme constitutionnelle de 2006, 26 provinces avec comme capitale, Kinshasa, une mégapole de plus de 10 millions d'habitants. La RDC est l'un des pays les plus pauvres du monde, se retrouvant à l'avant dernier rang (186^{ème} sur 187 pays) au classement fondé sur l'indice de développement humain (IDH) 2014 [120]. On estime que 80 % de la population vit avec moins d'un dollar par jour et les dépenses totales de santé dans le pays sont

faibles (par exemple, seulement 13 USD par habitant et par an en 2012), les ménages étant les principaux contributeurs, suivis de près par l'aide multilatérale, tandis que le gouvernement central ne contribue que pour 11% [121]. Certaines analyses ont été étendues au niveau sous régional du continent Africain, pour permettre d'avoir une idée plus large de la situation.

3.2. Conception de la thèse

Ce travail de thèse a été mené de 2017 à 2021 en combinant des approches quantitatives et qualitatives à travers des études originales et des revues systématiques de la littérature. La méthodologie spécifique de chacune de ces études est détaillée dans le Chapitre correspondant.

De façon générale, deux revues systématiques ont été conduites pour résumer la situation de la résistance prévalant à l'échelle sous régionale de l'Afrique vis-à-vis de l'ART avant janvier 2019 (**Chapitre 4**) et, à l'échelle de la RDC, vis-à-vis de différents antipaludiques ayant été utilisés dans la politique antipaludique nationale jusqu'en juillet 2021 (**Chapitre 5**). Pour ce faire, les lignes directrices du PRISMA (« Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses ») ont été observées en impliquant quatre étapes – l'identification, la sélection, l'éligibilité et l'inclusion – pour l'examen des sources d'information et l'intégration des preuves [86, 122]. Chaque étape était exécutée par deux équipes indépendantes dont les résultats étaient confrontés afin d'inclure uniquement les articles de qualité acceptable en évitant au maximum les biais. Les données extraites des articles primaires ont été résumées sous forme de synthèses narratives, puis géo-référencées et projetées sous forme de cartographies géographiques.

Ensuite, deux études quantitatives ont été menées au moyen d'enquêtes observationnelles transversales. Ces dernières visaient les parturientes et leurs nouveau-nés (**Chapitre 6**) ainsi que les sujets atteints de paludisme (**Chapitre 7**) au moment de leurs visites médicales individuelles pour une prise en charge dans

différents sites sentinelles de surveillance du paludisme en RDC. Pour ce faire, des questionnaires standardisés et des analyses biologiques des échantillons de sang avaient servi à générer les données. Les données recueillies avaient été analysées et résumées au moyen de paramètres de tendance centrale et de dispersion (ex. médiane et intervalle interquartile). Des modèles de régression divers avaient été employés pour évaluer les relations entre variables ou les effets de facteurs divers sur des variables d'intérêt.

Finalement, une étude qualitative (**Chapitre 8**) a été conduite pour décrire et analyser les possibles mécanismes de surveillance du paludisme pharmaco-résistant en RDC en impliquant les éventuels intervenants identifiés sur un mode raisonné. Ces mécanismes incluaient le système nouvellement établi à travers cette thèse, pour assurer la surveillance des parasites porteurs des marqueurs moléculaires de la résistance (MMR) aux antipaludiques en RDC. Pour y parvenir, des investigations à base d'observations participatives, de fouilles documentaires et d'entrevues suivant des guides préétablis ont été conduites. Les guides d'enquête étaient inspirés des outils du MECAT (« Monitoring and Evaluation Capacity Assessment Toolkit ») (www.measureevaluation.org). Les données recueillies ont été analysées et présentées selon une approche thématique déductive et organisées suivant un schéma SWOT – Strengths (Forces), Weaknesses (Faiblesses), Opportunities (Opportunités), Threats (Menaces) – afin d'explorer le rôle ainsi que les éventuels avantages et défis rencontrés par la surveillance du paludisme pharmaco-résistant au niveau du pays. Les différents arguments ont été étoffés par des données émanant de diverses ressources documentaires, notes d'observations et citations des interrogés.

Toutes les analyses statistiques, les figures et cartes géographiques de cette thèse ont été réalisées grâce aux différents packages offerts dans l'environnement R.

3.3. Définitions – mutation, allèle et haplotype

Ce travail est basé sur l'utilisation des approches de biologie moléculaire pour détecter des traits génétiques associés à la pharmaco-résistance du *P. falciparum* et reconnus comme MMR. Ces derniers peuvent revêtir plusieurs formes et avoir une signification clinique ou biologique variée qui dépend des propriétés du médicament antipaludique ciblé, de son mode d'action, des espèces plasmodiales en cause et de la fonction biologique du gène altéré. En faisant allusion à ces traits génétiques, nous évoquons dans ce travail plusieurs concepts tels que les « mutations », « allèles » ou « haplotypes » qu'il convient de définir ici sommairement.

Un **gène** est la sous-unité du génome faite d'une séquence discrète et héritable des nucléotides dont l'expression sous forme d'une séquence protéique à base d'acides aminés affecte les caractères d'un organisme, ici le parasite du *Plasmodium*. Un gène individuel ou même un nucléotide d'un gène donné possède donc une position donnée dans le génome d'une espèce, on parle de **locus** génique. L'expression d'un gène en protéine se fait par étapes séquentielles (transcription d'ADN en ARN messenger et traduction d'ARN en chaîne peptidique faite d'acides aminés) selon un script prédéfini, le **code génétique**. Ainsi, chaque triplet de nucléotides successifs sur un gène ou sur un ARN messenger (codon) sera traduit en un acide aminé spécifique. Pour désigner différents résidus d'acides aminés, les abréviations à une lettre suivantes sont utilisées : A=alanine, C=cystéine, D=acide aspartique, E=acide glutamique, F=phénylalanine, G=glycine, H=histidine, I=isoleucine, K=lysine, L=leucine, M=méthionine, N=asparagine, P=proline, Q=glutamine, R=arginine, S=sérine, T=thréonine, V=valine, W=tryptophane et Y=tyrosine.

Au cours de différents processus biologiques, les gènes peuvent acquérir des changements dans leurs séquences nucléotidiques appelés **mutations**. Chacune des versions possibles d'une séquence génétique trouvable dans la population, constitue un **allèle**. Dans leurs formes les plus simples, les mutations peuvent se

présenter sous forme des polymorphismes mononucléotidiques spécifiques (SNP) par substitution d'un nucléotide isolé par un autre. Ces substitutions sont dites **non-synonymes** (NS) lorsqu'elles engendrent une altération de la structure de la séquence protéique et deviennent héritable. Une mutation NS est décrite comme étant **faux-sens** quand un acide aminé de référence situé à un emplacement spécifique de la chaîne protéique (position du codon) est remplacé par un autre acide aminé - par exemple, M476I indique que la méthionine (M) à la position du codon 476 a été remplacée par l'isoleucine (I). Parfois, la substitution NS correspond à une mutation **non-sens** résultant du remplacement d'un résidu d'acide aminé de référence par un codon stop au sein de séquence mutée qu'indiquera un astérisque (*). Une mutation est dite **synonyme** (Syn) lorsqu'elle résulte d'une mutation dite **même-sens** qui n'engendre pas d'altération de la structure de la séquence protéique. A défaut d'une substitution, une mutation peut se présenter sous forme d'une **insertion** ou d'une **délétion** d'un ou plusieurs nucléotides, désignées par le terme **INDEL**. En cas d'INDEL, le trait de soulignement (_) indiquera la suppression (délétion) d'un résidu d'acide aminé de référence à une position de codon donnée chez le mutant – par exemple, I56_ désigne la délétion de l'isoleucine (I) en position 56.

Une mutation entrainera ainsi la présence d'organismes porteurs de différents allèles du gène, et qui participeront à la diversité génétique de la population. La fréquence relative d'une mutation non-synonyme dans la population sera définie ainsi par le rapport entre le nombre d'isolats porteurs de la mutation par rapport au nombre total d'organismes analysés pour le locus où se situe ladite mutation. L'ensemble des allèles analysés d'un organisme constitue son **génotype**. Les allèles peuvent être ainsi ceux d'origine (allèles de type sauvage) ou soit ceux dus à des mutations. Au cours du temps, ces allèles peuvent subir la pression de la sélection naturelle (ex. sous l'effet d'un antipaludique) et leur fréquence peut varier sous l'effet de la dérive génétique. Un **haplotype** est conçu comme un ensemble d'allèles situés côte à côte sur un gène ou sur plusieurs gènes

d'un chromosome et qui sont génétiquement liés et transmis comme un ensemble à la génération suivante. Dans le présent travail, les haplotypes sont présentés comme une succession d'acides aminés dont les éventuels sites mutés sont marqués par un soulignement. C'est le cas de l'haplotype IRN-GE que portent des mutants quintuples (porteurs d'une combinaison de cinq mutations sur les séquences de *PfDHPS* et de *PfDHFR*) résistants à la S-P.

CHAPITRE 4. CARTOGRAPHIE SPATIALE ET MOLECULAIRE DU POLYMORPHISME DU GENE *PfK13* EN AFRIQUE A L'ERE DE L'EMERGENCE DE LA RESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A L'ARTEMISININE : UNE REVUE SYSTEMATIQUE

Auteurs : Nadine Kayiba Kalenda, Doudou Malekita Yobi, Evariste Tshibangu-Kabamba, Vo Phuoc Tuan, Yoshio Yamaoka, Brecht Devleesschauwer, Dieudonné Makaba Mvumbi, Emile Okitolonda Wemakoy, Patrick De Mol, Georges Lelo Mvumbi, Marie-Pierre Hayette, Angel Rosas-Aguirre, Niko Speybroeck.

Article: Spatial and molecular mapping of *Pfkelch13* gene polymorphism in Africa in the era of emerging *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2021 Apr;21(4):e82-e92.

Lien : [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)

4.1. Résumé

Contexte : La propagation d'isolats de *P. falciparum* porteurs de mutations du gène *Pfk13* associées à la résistance à l'artémisinine (*PfART-R*) en Asie du Sud-Est menace les efforts de lutte visant l'élimination du paludisme. L'émergence de la *PfART-R* en Afrique pourrait entraîner un problème majeur de santé publique. Dans cette revue systématique, nous avons étudié la fréquence et la distribution spatiale des mutants du *Pfk13* en Afrique, y compris ceux ayant été liés à la *PfART-R* en Asie du Sud-Est.

Méthodes : Sept bases de données ont été consultées (PubMed, Embase, Scopus, African Journal Online, African Index Medicus, Bioline et Web of Science) à la recherche d'articles pertinents, ayant analysé le polymorphisme du gène *Pfk13* en Afrique avant janvier 2019. Conformément aux directives PRISMA, 53 études qui avaient séquencé le gène *Pfk13* de 23100 isolats d'échantillons dans 41 pays d'Afrique subsaharienne ont été inclus.

Résultats : La séquence *PfK13* était hautement polymorphe (292 allèles, dont 255 dans le domaine de l'hélice *PfK13*) mais comportaient des mutations se produisant à de très basses fréquences relatives. Des mutations non-synonymes ont été retrouvées dans seulement 626 isolats (2,7%) provenant d'Afrique de l'Ouest, Centrale et de l'Est. Neuf mutations différentes ayant été liées à la *PfART-R* en Asie du Sud-Est d'après l'OMS (F446I, C469Y, M476I, R515K, S522C, P553L, V568G, P574L et A675V) ont été détectées, principalement en Afrique de l'Est. Plusieurs autres mutations du *PfK13*, telles que celles mimant structurellement des mutations de la *PfART-R* notée en Asie du Sud-Est, ont également été identifiées ; mais leur pertinence clinique pour la résistance aux médicaments reste inconnue.

Conclusion : Cette revue systématique montre que l'Afrique, antérieurement considérée comme étant restée épargnée par la *PfART-R*, a néanmoins signalé des mutants liés à la résistance au cours de ces cinq dernières années. La surveillance fondée sur la détection des marqueurs moléculaires de la *PfART-R* peut fournir des informations précieuses pour la prise de décision cadrant avec les efforts pour la pérennisation de l'efficacité thérapeutique de l'artémisinine en Afrique.

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*, Artémisinine, Résistance, Afrique

4.2. Introduction

Les combinaisons thérapeutiques à base d'ART (CTA) constituent la clé de voûte de la lutte antipaludique en Afrique [123, 124]. Les CTA combinent l'action antipaludique rapide (mais de courte demi-vie) de l'ART ou de ses dérivés avec l'action plus lente (mais de plus longue demi-vie) des médicaments partenaires [7]. L'émergence et la propagation de la résistance du *P. falciparum* à l'ART (*PfART-R*) ayant été observée dans la sous-région du Grand Mékong (SGM) en Asie du Sud-Est au cours de la dernière décennie, représente un défi majeur pour la lutte antipaludique et les efforts d'élimination du paludisme [72, 125, 126].

Une migration inverse de la *Pf*ART-R vers l'Afrique (par comparaison à l'origine évolutive et la propagation historique du parasite [127] est un scénario redouté qui pourrait avoir de graves conséquences sur le fardeau mondial du paludisme car les thérapies alternatives sont peu nombreuses et ce continent regorge la majorité des cas [78, 128, 129]. Etant donné que la *Pf*ART-R n'est pas encore établie en Afrique, sa surveillance sur le continent s'avère nécessaire dans une perspective de santé globale [78]. Les TET constituent la méthode standard pour évaluer et surveiller la *Pf*ART-R; cependant, un financement insuffisant limite le recours à ces études dans les pays africains [7, 10, 130]. Alternativement, les SNP situés sur le gène kelch 13 du *P. falciparum* (*Pf*k13) et ayant été corrélés avec le retard de clairance parasitaire offrent un potentiel accru pour leur utilisation comme marqueurs moléculaires dans la surveillance de la *Pf*ART-R [87, 105, 131]. Toutefois, plus de 100 SNP du *Pf*K13 ont été rapportées en Afrique, mais il existe encore peu de preuves appuyant la circulation des mutants de la *Pf*ART-R sur le continent [15, 78]. Dans cette revue systématique, nous analysons les études ayant rapporté les SNP du *Pf*K13 dans différents pays africains afin de déterminer les fréquences relatives et la distribution spatiale des parasites porteurs des SNP y compris les mutations actuellement considérées comme étant des marqueurs de la *Pf*ART-R.

4.3. Méthodes

Stratégie de recherche et critères de sélection

Cette revue systématique est fondée sur les directives du PRISMA [132, 133]. Sept bases de données médicales électroniques (PubMed, Embase, Scopus, African Journal Online, African Index Medicus, Bioline et Web of Science) ont été fouillées à la recherche d'articles évalués par les pairs et publiés avant janvier 2019, qui satisfaisaient à des critères PICOS (« Population, Intervention, Comparator, Outcomes, and Study design ») préalablement fixés (**Tableau 4.1**).

Tableau 4.1: Critères de sélection des articles sur la base de l'algorithme PICOS

Critère	Critère d'inclusion	Critère d'exclusion
« Population »	Participants infectés par <i>P. falciparum</i> , prélevés en Afrique et diagnostiqués par PCR	- Cas de paludisme exportés vers des pays non africains - Échantillons d'origine géographique inconnue - Échantillons avec des espèces non <i>P. falciparum</i>
« Intervention »	Extraction d'ADN à partir d'échantillons sanguins avec <i>P. falciparum</i> détecté, suivie d'une amplification et d'une détermination du génotype du gène <i>PfK13</i> par séquençage génétique	- Variations de <i>PfK13</i> fondées sur des méthodes autres que les techniques déterminant le génotype par le séquençage (par exemple, analyse par RFLP)
« Comparator »	Non applicable à cette revue	- Non applicable à cette revue
« Outcomes »	SNP de la séquence <i>PfK13</i>	Données de séquences non relatives au <i>PfK13</i>
« Study Design »	Articles évalués par des pairs publiés avant janvier 2019 en tant qu'étude observationnelle ou essai clinique avec des données provenant d'isolats de <i>P. falciparum</i> nouvellement analysés	- Lettres, commentaires, résumés de conférence, présentations de conférence - Revues systématiques, méta-analyses - Etudes fondées exclusivement sur des modèles animaux - Données relatives aux isolats de <i>P. falciparum</i> génétiquement modifiés lors d'expériences en laboratoire

(*) PCR : Polymerase chain-reaction ; *PfK13* : kelch 13 du *P. falciparum*

Une stratégie de recherche à base de versions française et anglaise de mots-clés issus du « Medical Subject Headings 2018 » ainsi que de termes libres a été prédéfinie comme suit : (« malaria » OR « *falciparum* » OR « paludisme ») AND (« marqueur moléculaire » OR « molecular marker » OR « kelch13 » OR « *Pfkelch13* » OR « k13 » OR « *Pfk13* ») AND (« Africa » OR « Afrique » OR chaque nom des 54 pays africains). Aucun filtre (par exemple, la restriction des langues) n'avait été imposé afin d'assurer la plus large possible inclusion d'articles potentiellement informatifs. Des recherches sur Internet ont permis d'inclure des références additionnelles identifiées dans les articles primaires. Les articles inaccessibles en texte intégral ont été sollicités auprès des auteurs correspondants. Bien que les articles de revue précédents n'aient pas été inclus dans l'analyse finale,

ils ont été explorés comme sources éventuelles pour des articles supplémentaires. Les études présentant des données provenant d'une région non identifiée, les revues systématiques antérieures, les articles de modélisation, les articles basés uniquement sur des isolats génétiquement modifiés, les présentations dans des conférences, les articles avec des informations insuffisantes et les lettres ou correspondances aux éditeurs ont été exclus de cette revue.

Sélection d'études, évaluation de la qualité et gestion des données

Le processus de collecte de données était structuré de manière à adresser toute possibilité d'incertitude ou de données manquantes. Deux équipes masquées (NKK, DYM et ARA ; ETK, VPT et YY) ont travaillé indépendamment à chaque étape du processus (recherche documentaire, évaluation de la pertinence des articles, évaluation de la qualité des articles et leur validation, ainsi que l'extraction des données) avant de recouper et de fusionner les résultats subséquents. Les variables extraites des études primaires incluaient des informations générales de l'article (auteurs, titre de l'étude, année de publication, emplacement géographique de l'étude), les caractéristiques de l'étude (conception de l'étude, période d'échantillonnage, moment de collecte d'échantillons pendant l'enquête, caractéristiques des participants, contexte, taille de l'échantillon et méthodes analytiques employées) ainsi que les informations sur les SNP (loci séquencés, allèles trouvés, nombre d'isolats séquencés à des loci spécifiques et nombre d'isolats pour chaque allèle spécifique). L'échelle de Newcastle-Ottawa a été utilisée pour évaluer les articles sélectionnés sur base de trois critères de qualité: la représentativité des échantillons (maximum d'une étoile), la taille de l'échantillon (au maximum, une étoile) et le résultat de l'étude (au maximum, trois étoiles) [134]. En ce qui concerne les résultats des SNP, la définition correcte du génotype (tenant compte de la séquence de référence) et la nomenclature correcte des mutations suivant les recommandations standard en diagnostic moléculaire [135, 136] ont été employés pour attribuer des étoiles de cotation de la qualité des

articles. Seules les études de qualité modérée (deux à trois étoiles) et élevée (quatre à cinq étoiles) ont été incluses dans cette revue systématique.

Définitions

La *PfART-R* correspond à une clairance parasitaire retardée (ne conduisant pas nécessairement à l'échec thérapeutique) après un traitement par l'artémisinine ou un de ses dérivés et qui, *in vitro*, représente une résistance partielle qui n'affecte que les parasites au stade de l'anneau [71, 137]. Les mutations de la *PfART-R* sont des SNP situés dans le domaine de l'hélice du *PfK13* et associés à la *PfART-R* au cours d'essais *in vitro* ou *in vivo*. Notre revue systématique a catégorisé les mutations de la *PfART-R* en trois groupes en se basant sur la liste de 31 MMR publiée par l'OMS en août 2018 [87]. Premièrement, il y a les MMR validés pour la *PfART-R* qui sont des mutations significativement associées à la fois à un retard de clairance parasitaire *in vivo* après traitement à l'ART ou ses dérivés et à une sensibilité réduite *in vitro* après exposition des parasites au médicament ; il s'agit de F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H et C580Y. Deuxièmement, il y a les candidats MMR qui sont des mutations significativement associées à un retard de clairance parasitaire *in vivo* mais restant à être confirmées par des essais *in vitro*. Il s'agit de P441L, G449A, C469F, A481V, P527H, N537I, G538V, V568G, P574L, F673I et A675V. Enfin, il y a les marqueurs moléculaires suspects de la *PfART-R* qui sont des mutations soupçonnées d'être associées à un retard de clairance parasitaire *in vivo* sans toutefois atteindre un niveau de signification statistique suffisant en raison du faible nombre de mutants observés. Il s'agit de D452E, C469Y, Lys479Ile, R515K, S522C, N537D, R575K, M579I, D584V, P667T et H719V. Au reste, des mutations qui étaient structurellement similaires aux MMR ont également été mises en évidence dans cette revue bien que leur pertinence clinique ne soit pas encore établie. Ce sont les mutations mimant les MMR.

Synthèse des données

Étant donné que les études rapportant les SNP du *PfK13* avaient des conceptions différentes et utilisaient principalement un échantillonnage de convenance, leurs données n'étaient pas adaptées à une combinaison dans une approche méta-analytique. Les processus de séquençage ont fourni des longueurs variables de séquences génétiques résultant en diverses gammes de loci analysées pour la découverte d'allèles dans les études. Une synthèse narrative a été ainsi réalisée pour organiser de façon systématique les informations recueillies. Les SNP du *PfK13* ont été définis en référence à la séquence de type sauvage *PF3D7_1343700*, disponible dans la base de données de protéines UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IDQ2>). Les fréquences relatives de chaque allèle ont été résumées en utilisant les valeurs médianes et les intervalles interquartiles. Les proportions de mutants avec au moins un changement non-synonyme (NS) du gène *Pfk13* dans chaque site géographique ont été calculées. Les données des différents rapports et emplacements ont été géo-référencées et localisées avant d'être projetées sur des cartes pour afficher les profils spatiaux et moléculaires à l'aide des packages ggplot2 [138], ggmap [139] et rgdal [140] dans R (version 3.5.3) [141]. Le risque de biais a été minimisé en excluant les études sur les cas de paludisme exportés hors d'Afrique et les communications répétées sur les mêmes isolats.

4.4. Résultats

Une liste de 3756 articles rapportant des SNP du *PfK13* a été identifiée à travers les bases de données fouillées, y compris quatre articles retrouvés manuellement. Après élimination de 2236 articles dupliqués, 1520 articles ont été examinés dont 1467 ont été jugés inéligibles sur base des critères PICOS définis pour la revue (**Figure 4.1**). Au total, 53 études ont été incluses et rapportaient des échantillons d'isolats de *P. falciparum* séquencés avec succès pour *PfK13* dans 41 pays

africains. Les caractéristiques de base de ces études sont détaillées en ligne ([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)) [15, 44, 78, 137, 142-188].

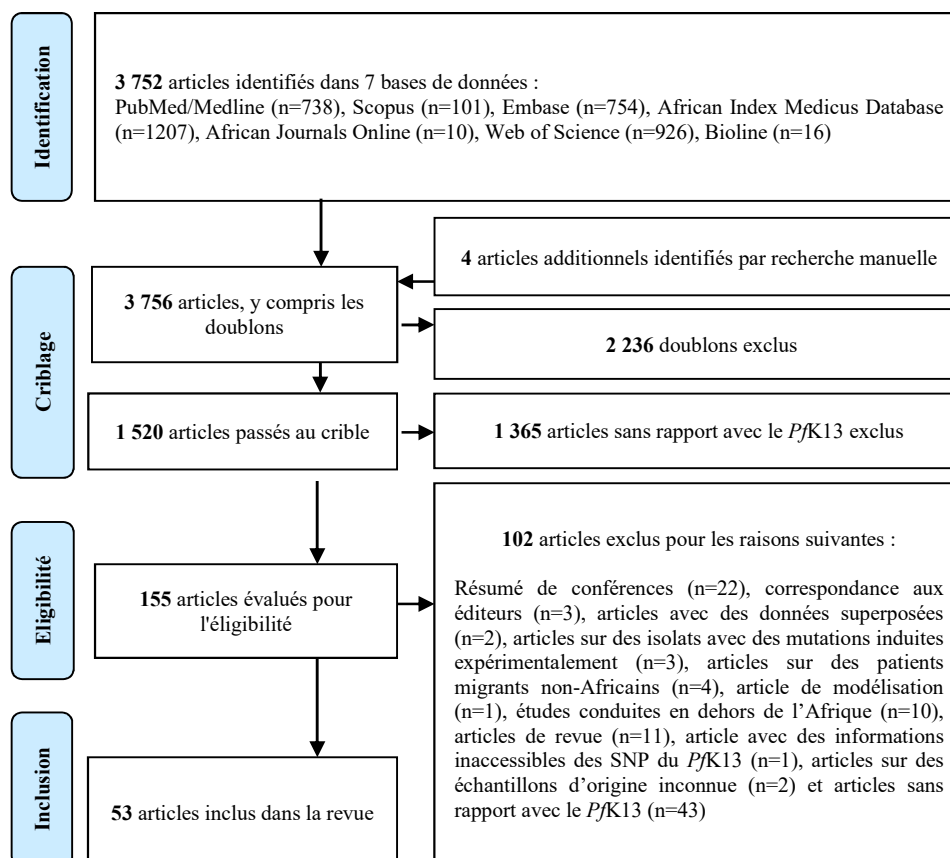


Figure 4.1. Diagramme PRISMA de la revue systématique*.

(*) *PfK13*=la séquence du *kelch13* de *P. falciparum* ; SNP=polymorphismes mononucléotidiques spécifiques.

Les méthodes analytiques utilisées dans les études étaient la PCR nichée suivie d'un séquençage par méthode de Sanger (49 études), le séquençage d'amplicons ciblés par méthodes de nouvelle génération (deux études), le séquençage par méthodes de nouvelle génération des génomes entiers de *P. falciparum* suivi d'une mesure d'associations à l'échelle génomique (une étude) et l'alignement des

séquences générées par méthodes de nouvelle génération par rapport aux séquences de référence ciblées (une étude). Différents protocoles ont été utilisés pour l'exploration des SNP du gène *Pfk13*, avec des longueurs de séquence allant de 445 à 2438 paires de bases.

Quarante-quatre études ont identifié à la fois des isolats de type sauvage et des mutants du *PfK13*, et neuf n'ont trouvé que des isolats de type sauvage. Un total de 24652 isolats de *P. falciparum* ont été analysés dans les études sélectionnées, donnant 23100 isolats séquencés avec succès sur des loci du gène *Pfk13*. La majorité d'isolats (22474 isolats [97,3%]) portaient un gène *Pfk13* fait soit d'une séquence de type sauvage ou soit d'une séquence ne présentant que des mutations synonymes (Syn). Les 626 isolats restants (2,7%) présentaient des mutations NS, dont 604 (2,6%) ont été des substitutions faux-sens dans la séquence d'acides aminés. D'autres mutations NS comprenaient 15 insertions (0,06%), quatre délétions (0,02%) et trois substitutions non-sens (0,01%) (Accessible au [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)). Tous les 41 pays africains rapportant des SNP du *PfK13* dans cette revue étaient situés en Afrique subsaharienne (Accessible au [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)). Les mutations NS du *PfK13* étaient absentes de la totalité des parasites collectés dans 11 pays : Afrique du Sud, Botswana, Burundi, Guinée Bissau, Libéria, Mauritanie, Sierra Leone, Somalie, Soudan du Sud, Soudan et Zimbabwe. Les haplotypes des séquences étaient hétérogènes dans les 30 autres pays, avec des enquêtes détectant aussi bien des allèles de type sauvage que des mutations NS du *PfK13* (au moins un seul isolat portant une mutation NS). Des proportions relatives élevées (> 50%) et intermédiaires (40-50%) d'isolats porteurs des mutations NS du *PfK13* ont été signalées en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Nigéria) et en Afrique de l'Est (Kenya et Ouganda ; **Figure 4.2**). La majorité des loci polymorphes du *PfK13* (149 sur 182 [81,9%]) ont été détectés dans la séquence du domaine de l'hélice (c'est-à-dire en aval de la position du codon 440), avec 255 variations alléliques (213 allèles NS) parmi un total de 292 allèles mis à jour dans cette revue (**Figure 4.3**). K189T était

l'allèle NS le plus fréquemment rapporté dans les études de séquençage du gène *Pfk13* et A578S était l'allèle NS le plus fréquemment rapporté dans les études de séquençage partiel du domaine de l'hélice *PfK13*. K189T a été observé chez 145 mutants avec des fréquences relatives par enquête allant de 0,8% à 50% (médiane 32,8%), tandis que A578S a été signalé chez 98 mutants à des fréquences relatives par enquête de 0,2% à 7,1% (médiane 1,4%). K189T et A578S s'étendaient sur plusieurs pays à des fréquences relatives variables et il n'y avait pas de profils géographiques distinctifs dans leur distribution (Accessible au [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)). Les fréquences relatives des mutations NS du domaine de l'hélice *PfK13* sur les sites étudiés variaient de 0,08% à 10,3% (Accessible au [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)).

Seuls 35 (0,15%) de tous les 23100 isolats séquencés enregistrés dans cette revue systématique avaient des allèles classés comme candidats MMR par l'OMS: C469Y (Ouganda) [143, 157], R515K (Zambie) [78], S522C (Togo, République Centre Africaine, Gabon, RDC, Ouganda et Kenya) [6, 78, 155], V568G (Kenya) [137], P574L (Rwanda) [180] et A675V (Ouganda et Rwanda) [143, 157, 180]. En outre, des marqueurs moléculaires validés pour la *PfART-R* selon l'OMS ont été retrouvés auprès d'au moins un isolat dans quatre pays: F446I (Mali) [176], M476I (Tanzanie) [159], et P553L (Kenya et Malawi; **Figure 4.4.**) [188].

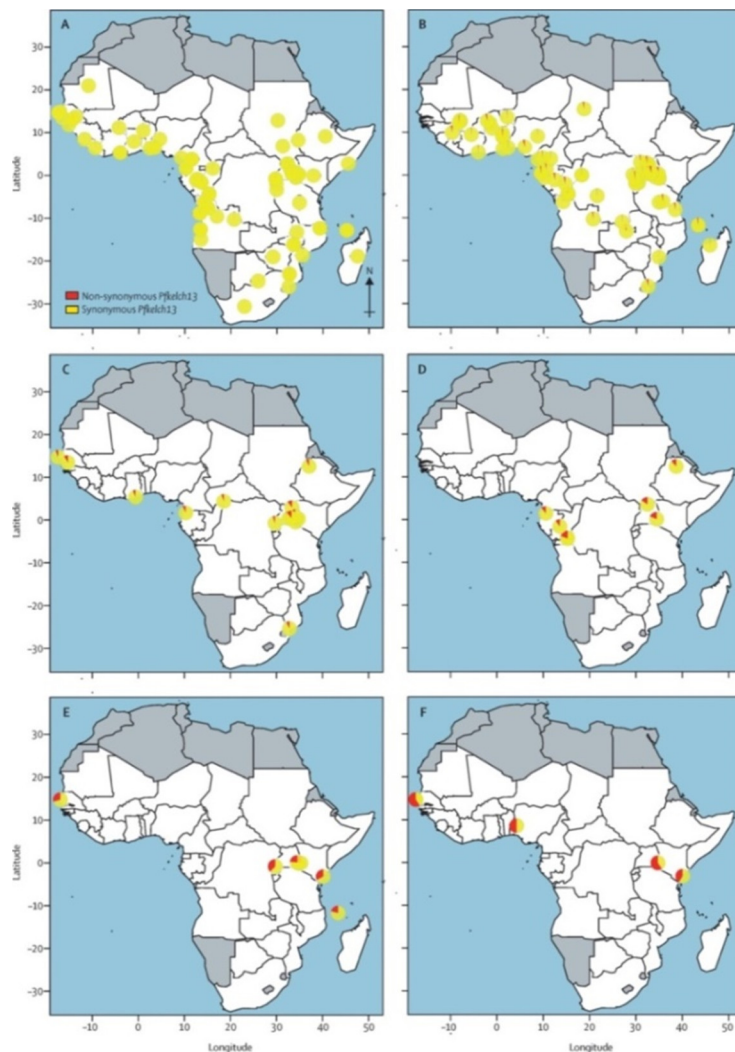


Figure 4.2. Cartes géographiques affichant les proportions d'isolats porteurs de mutations Non Synonyme du *Pfk13* en Afrique.

Les camemberts affichés sur ces cartes représentent les proportions d'isolats porteurs d'au moins une mutation non-synonyme (NS ; partie rouge de camemberts) et ceux porteurs uniquement des mutations synonymes ou des séquences de type sauvage (WT/Syn ; partie jaune des camemberts), dans le gène du *Pfk13*. Les sites rapportant uniquement des isolats WT/Syn sont montrés sur la carte A. Les cartes individuelles restantes regroupent différents sites qui ont enregistré une proportion très faible (carte B : >0 à <5%), faible (carte C : 5 à <10%), modérée (carte D : 10 à 20 %), faiblement intermédiaire (carte E : > 20 à <40 %) et intermédiaires à élevées (carte F : > 40 à <80 %) d'isolats porteurs des mutations NS du *Pfk13*.



Figure 4.3. Carte moléculaire des allèles observés dans le domaine de l'hélice du PfK13 des isolats africains de *P. falciparum*.

Cette figure montre les variations alléliques des résidus d'acides aminés dans les lames (1 à 6) du domaine de l'hélice du PfK13 (après la position 440) sur la base de la séquence de référence 3D7 de *P. falciparum*. Sur les 280 loci de cette séquence, 150 étaient polymorphes avec des allèles synonymes (Syn) et non-synonymes (NS). Les loci rapportés uniquement avec un résidu de type sauvage ou synonyme (WT/Syn) sont représentés par des cases ombrées en jaune. Les loci signalés avec des mutations NS sont ombrés en rouge, en bleu clair et en bleu foncé respectivement lorsqu'ils sont formellement liés ou non à PfART-R.

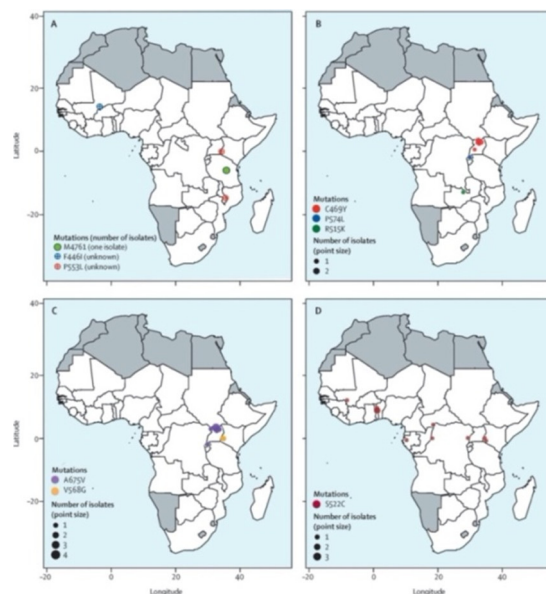


Figure 4.4. Cartes géographiques affichant les sites d'échantillonnage qui ont enregistré des isolats porteurs des marqueurs moléculaires de la résistance en Afrique. Les points projetés sur ces cartes représentent des isolats porteurs de mutations associées à *Pf*ART-R en Asie du Sud-Est selon la liste OMS 2018 des marqueurs moléculaires de la résistance. La taille des points est proportionnelle au nombre d'isolats qui ont été identifiés à chaque emplacement d'échantillonnage. Les mutations avec un nombre inconnu d'isolats sont représentées par des cercles barrés.

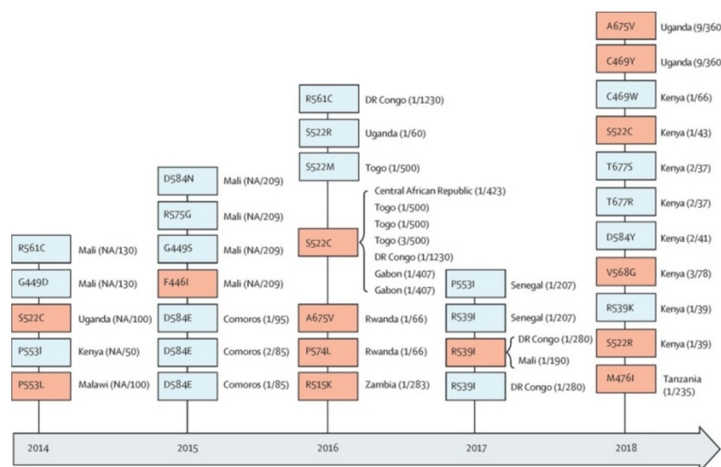


Figure 4.5. Evolution de la déclaration des marqueurs moléculaires de la résistance au cours de la période 2014-2018.

Ce graphique présente le signalement, au fil du temps, de différents marqueurs moléculaires de la résistance (ombrés en rouge) et de mutations mimant les marqueurs de la *Pf*ART-R

(ombrés en bleu clair) en Afrique. Les années 2014 à 2018 indiquent l'année de publication des articles rapportant les mutations.

Seize allèles mimant des MMR listés par l'OMS ont également été retrouvés auprès de 18 isolats (0,08% à 5,41% par site d'échantillonnage) dans sept pays: G449D et G449S (similaire à G449A) au Mali [176, 188], C469W (similaire à C469Y) au Kenya [155], M476K (similaire à M476I) en RDC [6], S522M et S522R (similaire à S522C) au Togo, en Ouganda et au Kenya [137, 175, 189], R539I et R539K (similaire à R539T) au Sénégal et au Kenya [137, 181], P553I (similaire à P553L) au Sénégal [181], R561C (similaire à R561H) au Mali et en RDC, R575G (similaire à R575K) au Mali [176], D584E, D584N et D584Y (similaire à D584V) au Comores, Mali et Kenya [44, 137, 176]; et P667R et P667S (similaire à P667T) au Kenya [137] (Accessibles au [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X)). Il y a eu une tendance à la hausse dans le rapportage des MMR et des mutations mimant des marqueurs de la *Pf*ART-R en Afrique depuis 2014, la première année de leur identification (**Figure 4.5**).

4.5. Discussion

Cet article est la première revue systématique se focalisant spécifiquement sur le polymorphisme du gène *Pfk13* en Afrique. Le gène *Pfk13* a été exclusivement exploré dans les pays d'Afrique subsaharienne, montrant une structure hautement polymorphe avec la plupart des variations alléliques situées dans le domaine de l'hélice de la protéine encodée. Malgré de faibles fréquences relatives de mutations NS dans ce domaine sur tout le continent, nous avons identifié des allèles mutants qui seraient associés à une diminution de la réponse à l'ART en Asie du Sud-Est en plus de plusieurs allèles structurellement mimant des mutations connues de résistance.

La grande variation allélique du domaine de l'hélice de *PfK13* (censé être situé dans une région conservée du génome de *P. falciparum*) pourrait être un reflet de

l'adaptation des parasites aux pressions sélectives agissant en Afrique (par exemple, l'utilisation de médicaments antipaludiques) [175, 190]. Par conséquent, ces informations devraient susciter des inquiétudes parmi les décideurs en matière de santé et appeler davantage d'efforts pour éviter l'utilisation de thérapies à base d'ART de mauvaise qualité (c.-à-d. contrefaites ou inférieures aux normes) et de monothérapies d'ART en Afrique [190, 191]. En effet, des médicaments aux concentrations sous-dosées ou des monothérapies réuniraient les conditions idéales pour la sélection et l'émergence des mutants du domaine de l'hélice du *PfK13* [15, 192]. Cette hypothèse est étayée par la génération expérimentale de mutations de l'hélice du *PfK13* sur des isolats d'origine génétique africaine qui ont subi une pression sélective *in vitro* de l'ART qui entraîne l'apparition ultérieure du phénotype de *PfART-R* [105, 193].

Contrairement à la fréquence élevée des mutations NS en Asie du Sud-Est (avec des proportions allant de niveaux intermédiaires à des niveaux de fixation au sein des parasites séquencés [78]), les mutations NS du *PfK13* retrouvées en Afrique se produisent à des fréquences relatives plus basses en dépit d'une forte variation allélique. L'introduction retardée de l'ART en Afrique entre 2000 et 2005, associée à un temps de pression médicamenteuse plus court par rapport à l'utilisation plus ancienne de l'ART en Asie du Sud-Est depuis les années 1970, pourrait expliquer la rareté d'isolats avec des mutations NS en Afrique [194]. De plus, des études menées dans plusieurs pays en Afrique, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud avaient suggéré que les mutations NS du *PfK13* signalées dans les pays africains pourraient être dues à une adaptation locale plutôt qu'à une importation d'Asie, car les allèles étaient pour la plupart spécifiques à l'Afrique et structurellement différents de ceux observés en Asie du Sud-Est [15, 78, 188].

Les allèles africains du *PfK13* comprenaient neuf mutations NS comptées parmi les 31 MMR listés par l'OMS sur la base d'études réalisées principalement en Asie du Sud-Est [87]. Six de ces mutations, à savoir F446I, M476I, P553L, V568G, P574L et A675V, ont été signalées comme étant fortement associées à un retard de

clairance parasitaire *in vivo* [15, 105, 195, 196]. Cependant, seuls F446I, M476I et P533L ont montré en plus une réponse diminuée à l'ART *in vitro*; ils sont donc considérés comme des MMR validés pour la *Pf*ART-R par l'OMS [87, 105, 131, 197]. A675V, bien que non répertorié comme marqueur moléculaire validé de la *Pf*ART-R, a montré une réponse altérée à l'effet de l'ART *in vitro* dans un isolat clinique d'Ouganda [157]. De ces mutations, seul F446I a été trouvé en Afrique de l'Ouest (Mali), tandis que M476I, A675V, P553L, P574L et V568G ont été signalés dans la région des Grands Lacs en Afrique de l'Est (Kenya, Ouganda, Malawi, Zambie, Tanzanie et Rwanda). Les trois autres mutations identifiées auprès d'isolats africains (S522C, C469Y et R515K) pourraient également être liées au ralentissement de la clairance parasitaire sous l'effet de l'ART; cependant, selon l'OMS, il n'y a pas de preuve significative de cette association en raison du faible nombre des mutants évalués dans les enquêtes [87]. Des parasites porteurs de la mutation S522C ont été retrouvés dans plusieurs pays africains (Mali, Gabon, République centrafricaine, Togo, RDC, et au Kenya) [78, 155, 180]. Cette mutation avait été corrélée avec une clairance parasitaire retardée chez un isolat (d'Asie du Sud-Est) sur les trois ayant été évalués *in vivo* (dont un isolat provenant de la RDC) [15, 198]. De même, deux mutants C469Y ont été associés à une faible clairance parasitaire et à une parasitémie restée positive au troisième jour après un traitement à l'ART en Asie du Sud-Est [198, 199]. Cependant, dans notre revue systématique, l'unique isolat africain (d'Ouganda) portant cette mutation et ayant été évalué *in vitro* n'a pas montré de réponse réduite à l'ART [157]. Contrairement à S522C et C469Y, les données accumulées pour la mutation R515K méritent d'être prises en compte dans les futures listes de MMR. En effet, plus de dix mutants R515K originaires d'Asie du Sud-Est ont été évalués et sont restés associés à un retard de clairance parasitaire après traitement du paludisme à base d'ART [164, 196, 198]. Ainsi donc, neuf mutations NS de l'hélice du *Pf*K13 classées par l'OMS comme MMR validés, candidats ou suspects en plus des 245 autres mutations non classés ont été enregistrées lors de la rédaction de cette revue systématique. La plupart des

mutations non classées n'ont jamais été explorées expérimentalement pour une quelconque fonction biologique parce qu'elles ne remplissaient pas les critères définis à cette fin (par exemple, fréquence élevée du nouvel allèle fait d'une mutation NS, preuve de dissémination de l'allèle ou association préliminaire avec une résistance clinique) [78]. Seize substitutions d'acides aminés parmi les mutations inexplorées retrouvées dans cette revue étaient structurellement similaires aux mutations de la *PfART-R* listées par l'OMS - notamment G449D, G449S, C469W, M476K, S522M, S522R, R539I, R539K, P553I, R561C, R575G, D584E, D584N, D584Y, T677R et T677S. A titre illustratif, G449D et G449S observés au Mali [176] miment la mutation de *PfART-R* G449A. Ils se produisent sur un locus connu pour être accessible à la glycine (G449) et établissant un réseau de liaisons hydrogène utile à la fonction protéique du *PfK13* [200]. En altérant ce réseau de liaisons hydrogène, ces deux allèles africains altèrent probablement la structure fonctionnelle du domaine de l'hélice du *PfK13* et pourrait générer la *PfART-R* [200]. La modélisation moléculaire peut ainsi fournir des informations sur l'impact des mutations inexplorées sur la structure protéique *PfK13* et le phénotype des parasites vis-à-vis l'ART ; cependant, la recherche conventionnelle (études *in vitro* ou *in vivo* utilisant des parasites transgéniques ou cliniques) reste nécessaire pour confirmer leur pertinence fonctionnelle [78]. Jusqu'à ce que l'effet fonctionnel de ces mutations similaires aux MMR soit clarifié, nous suggérons de les inclure autant que possible dans les activités de surveillance moléculaire de la *PfART-R* en Afrique.

Il est important de mentionner que les parasites africains pourraient avoir leur propre préférence génétique pour sélectionner une *PfART-R* qui différerait des parasites d'Asie du Sud-Est [123, 128]. La découverte de la *Pfcoronine* en 2018 en tant que deuxième gène lié à la *PfART-R* suggère que la résistance de type non-*PfK13* pourraient émerger indépendamment dans des conditions naturelles en Afrique [86, 122, 201]. Des mutants de la *Pfcoronine* associés à la *PfART-R* ont été sélectionnés en effet parmi des parasites d'origine sénégalaise, en utilisant le

même mode expérimental de sélection *in vitro* qui avait associé les mutations du *PfK13* à une sensibilité réduite à l'ART chez des parasites d'origine tanzanienne [105, 200, 201]. Bien que des parasites encodant une *Pfcoronin* mutée ne soient pas encore détectés parmi les isolats cliniques, la similitude structurelle entre cette protéine et le *PfK13* a pu fournir des informations sur les mécanismes moléculaires de la résistance à l'ART [86, 122, 202]. Le suivi de l'émergence des parasites mutants du *PfK13* en Afrique est très important, certes, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier d'autres gènes possibles liés à la *PfART-R* [123].

Notre revue systématique a eu plusieurs faiblesses. Premièrement, aucune information n'a été obtenue sur les zones de paludisme non endémique – par exemple, les pays du Maghreb (tels que l'Algérie, la Libye, le Maroc, l'Égypte, le Sahara occidental et la Tunisie) – où la menace de la *PfART-R* pourrait également exister du fait d'importantes migrations humaines en provenance d'Afrique subsaharienne. Les futures enquêtes devraient combler les lacunes observées sur la cartographie actuelle. Deuxièmement, l'hétérogénéité des plans d'enquête, des méthodes d'échantillonnage (par exemple, des échantillons de commodité) et des approches analytiques dans les études individuelles (par exemple, différentes longueurs de séquences de *PfK13* analysées, différents temps d'échantillonnage dans les enquêtes) ne permettaient pas de regrouper les articles selon une méta-analyse standard. Troisièmement, les informations primaires (par exemple, le moment précis de la collecte) étaient très variables ou n'étaient pas disponibles dans certaines enquêtes, ce qui a empêché d'analyser les tendances temporelles. A la place, nous avons évalué la tendance temporelle du rapportage des mutations de *PfART-R*. Quatrièmement, l'inexactitude du nombre d'isolats portant des allèles dans certaines études examinées et les mutations signalées avec une origine imprécise pourraient avoir conduit à une sous-estimation de la fréquence des allèles de *PfART-R* (par exemple, P553L au Malawi [188] ou F446I au Mali [176]). Pour ces études, la fréquence des sites présentant ces mutations a été rapportée sans

attribuer de fréquences alléliques. Enfin, notre revue n'incluait pas d'études rapportant des patients migrants qui retournaient dans leur pays d'origine en provenance d'Afrique avec des isolats porteurs de mutations du *PfK13*. Par exemple, trois marqueurs *PfART-R* (C580Y, M579I et R539T) retrouvés sur des isolats de patients retournant en Asie en provenance d'Afrique ont été exclus de cette revue [80, 203]. Il est très probable que ces mutations liées à la *PfART-R* aient été acquises en dehors de l'Afrique car aucun parasite issu d'un patient autochtone des régions africaines concernées n'a pu être trouvé porteur de ces mutations. Mais une acquisition de ces parasites mutants en Afrique ne peut être totalement exclue même si son éventualité est minime.

4.6. Conclusion

Malgré les limites ci-dessus mentionnées, cette revue systématique fournit une référence de base précieuse pour la construction et le renforcement des activités de surveillance dans les pays africains afin de prévenir l'émergence et la propagation ultérieure de la *PfART-R*. Le message de cet article n'est pas celui d'engendrer une défiance vis-à-vis des CTA qui sont encore efficaces en Afrique, mais plutôt de faire un appel à la vigilance et à davantage d'efforts de surveillance contre une possible émergence de la *PfART-R* localement sur le continent. Par conséquent, une surveillance proactive fondée sur la détection des MMR ainsi qu'une consolidation et une interprétation en temps opportun des résultats de cette surveillance peuvent contribuer à la prise de décision basée sur des évidences afin de pérenniser l'efficacité de l'ART en Afrique. Toute introduction possible des allèles connus comme étant liés à la *PfART-R*, l'augmentation temporelle de la fréquence des allèles autochtones et l'expansion de mutations NS mimant les marqueurs de *PfART-R* doivent être spécialement ciblées par les efforts de surveillance. Des efforts de recherche accrus (c'est-à-dire davantage de financement et d'explorations sur le terrain) sont nécessaires pour clarifier

l'importance fonctionnelle d'autres mutations de l'hélice du *PfK13* en Afrique et pour identifier d'autres gènes possibles de la *PfART-R* au même titre que la *Pfcoronine*.

Contribution des auteurs

NS et NKK ont conçu l'étude. NKK, ETK, ARA et BD ont rédigé le protocole. NKK, DYM, ARA, ETK, VPT et YY ont effectué la recherche documentaire, l'acquisition des données agrégées, l'examen des articles primaires et l'extraction des données. NKK, ETK et ARA ont analysé les données et établi des résumés. NKK, ETK, ARA, VPT, BD et NS ont rédigé la première ébauche du manuscrit. DMM, GLM, DYM, PDM, MPH, YY et EOW ont révisé la première ébauche du manuscrit. NS avait un accès complet à toutes les données de l'étude et avait la responsabilité finale de la décision de soumettre l'article pour publication. Tous les auteurs ont fourni une contribution conceptuelle et ont révisé et approuvé la version finale du manuscrit.

Remerciements

Cette revue systématique a été financée par l'Agence Belge de Coopération à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES). Le bailleur de fonds de l'étude n'a joué aucun rôle dans la conception de l'étude, la collecte de données, l'analyse des données, l'interprétation des données ou la rédaction du rapport.

Accessibilité des données

Une carte interactive avec les mutations du *PfK13* (**Figure S4.4.**) est disponible sur: <https://pfk13africa.cbra.be/>.

Les données supplémentaires plus détaillées sont accessibles sur : [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30493-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30493-X).

CHAPITRE 5. CARTOGRAPHIE SPATIO-TEMPORELLE DE LA SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO : EVIDENCES DECOULANT D'UNE LIVING SYSTEMATIC REVIEW

Auteurs : Nadine Kayiba Kalenda, Angel Rosas-Aguirre, Evariste Tshibangu-Kabamba, Natsuko Kaku, Yu Nakagama, Akira Kaneko, Yasutoshi Kido, Dieudonné Mvumbi Makaba, Doudou Yobi Malekita, Brecht Devleeschauwer, Pius Kabututu Zakayi, Patrick DeMol, Georges Mvumbi Lelo, Marie-Pierre Hayette, Paul Lusamba Dikassa, Niko Speybroeck.

Article: Spatial-temporal mapping for the surveillance of antimalarial drug resistance in the Democratic Republic of Congo: Evidence from a Living Systematic Review
(Article sous presse)

5.1. Résumé

Contexte : La surveillance de la pharmaco-résistance est une mesure épidémiologique nécessaire au renforcement de la politique contre le paludisme en RDC, un des pays les plus affectés au monde. Cette étude initie une Living Systematic Review qui vise à résumer la distribution spatio-temporelle des parasites du *Plasmodium* porteurs de MMR identifiés en RDC afin d'assurer leur surveillance périodique.

Méthodes : Cette revue systématique couvre la période antérieure à août 2021. Sept bases de données (PubMed, Embase, Scopus, African Journal Online, African Index Medicus, Bioline et Web of Science) ont servi à la recherche d'articles rapportant des altérations des gènes potentiellement impliquées dans la résistance aux antipaludiques en RDC.

Résultats : En tout, 27 études primaires ayant analysé de 2002 à 2021 un nombre médian de 180 [IQR : 95] isolats cliniques à la recherche des MMR aux

antipaludiques ont été incluses dans cette revue. Ainsi donc, une fréquence médiane de 32,1% [IQR : 48,8] d'isolats chloroquino-résistants encodant la mutation *PfCRT* K76T a été notée sur les différents sites enquêtés. Malgré une diminution globale de la prévalence de cette mutation notée de 2002 à 2021 (n=1555), d'importantes variations géographiques persistaient. En absence d'une résistance à l'ART établie dans le pays, certaines mutations sporadiquement identifiées dans le domaine de l'hélice du *PfK13* (ex. R561H) d'isolats analysés (n=5137 ; 2006-2020) témoignaient du risque d'émergence de la résistance à l'artémisinine. Sur les 3731 isolats analysés pour la résistance à la S-P (2002-2019), un profil modéré de résistance a été observé (*PfDHPS* A437G : 97,7% [IQR : 21,6] ; *PfDHPS* K540E : 45,2% [IQR : 51,6]) avec un quadruple ou quintuple mutant (IRN-GK ou IRN-GE) identifiable dans près de la moitié des parasites (45,2%) et prédominant dans l'Est du pays.

Conclusion : La pharmaco-résistance du paludisme constitue un problème majeur de santé publique en RDC devant être adressé par des mesures collectives et individuelles. Les résultats présentés constituent une base de référence pour la surveillance épidémiologique de cette pharmaco-résistance et pour la prise des décisions stratégiques de la politique antipaludique nationale.

Mots-clés : République Démocratique du Congo ; Paludisme ; Résistance ; Antipaludiques ; Mutations ; Marqueurs moléculaires de la résistance.

5.2. Introduction

La RDC occupe la 2^{ème} place dans le monde en termes du nombre des cas et décès associés au paludisme [1]. La lutte contre ce fléau repose principalement sur l'efficacité des médicaments utilisés pour la prise en charge des personnes infectées afin de réduire la morbi-mortalité et la transmission des parasites du *Plasmodium* dans le pays [7]. Cependant, les efforts de lutte contre le paludisme sont en permanence menacés par l'émergence et l'expansion de la résistance de

P. falciparum aux médicaments antipaludiques [204]. En effet, cette résistance des parasites est observée sur différents sites depuis plusieurs années, parfois à des taux pouvant être élevés, vis-à-vis des médicaments comme la chloroquine (CQ) et la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) [5]. En conséquence, à l'instar de la plupart des pays endémiques du paludisme, la CQ était devenue inefficace et avait dû être retirée de la pratique clinique dans l'espoir de son éventuelle réintroduction lorsque le niveau de résistance aurait diminué dans la population [205]. C'était sans compter sur la récente pandémie à la COVID19 qui est venu remettre à jour l'utilisation répandue de la CQ (et son dérivé, l'hydroxy-CQ) avec le risque d'accroître davantage le paludisme chloroquino-résistant dans le pays [206]. La S-P avait également été retirée du traitement curatif du paludisme avant d'être restreinte au traitement préventif intermittent du paludisme chez la femme enceinte (TPIg-SP) [33]. Mais la résistance sans cesse croissante à cette combinaison thérapeutique fait désormais craindre une perte totale de son efficacité pour le TPIg-SP dans un avenir proche alors que des traitements alternatifs restent limités [207]. En plus, la résistance à l'artémisinine (ART) – la pierre angulaire du traitement actuel de première ligne pour les formes simples et compliquée du paludisme – a émergé et se répand désormais dans les pays voisins de la RDC [73, 81, 82, 180, 208]. La surveillance de la résistance aux antipaludiques s'avère donc être une mesure épidémiologique salubre à mettre urgemment sur pied pour pouvoir appuyer les mesures nationales de contrôle du paludisme.

La présente étude initie une « Living Systematic Review » (LSR) conçue pour suivre régulièrement l'épidémiologie des parasites du *Plasmodium* résistants aux antipaludiques en RDC. Il s'agit d'un exercice de cartographie continue et en temps-réel des évidences progressivement apportées par les publications sur les polymorphismes des gènes associés à la résistance aux différents médicaments antipaludiques ainsi que de la fréquence relative et la distribution spatio-temporelle des parasites pharmaco-résistants en RDC. L'objectif de cette étude est de constituer une base des données de référence sur l'état de la résistance aux

antipaludiques en RDC, destinée à une mise à jour périodique dans le cadre de la LSR. A terme, les preuves actualisées à travers cette LSR faciliteront aux décideurs politico-sanitaires une prise de décisions plus éclairées sur les stratégies antipaludiques nationales et permettront une identification factuelle d'éventuelles lacunes susceptibles d'être adressées par la recherche, pour lutter plus efficacement contre le paludisme pharmaco-résistant dans le pays.

5.3. Méthodes

Mode d'actualisation de la LSR

Une LSR consiste à produire des résumés de qualité d'une recherche en santé qui sont ensuite mis à jour au fur et à mesure que de nouveaux résultats de recherche deviennent disponibles [209]. Par conséquent, un processus de monitoring des preuves est mis en place via des fouilles documentaires périodiques à travers les bases des données spécifiées dans la stratégie de recherche. Ainsi, tous les six mois, les lecteurs seront informés du statut de la LSR (c'est-à-dire que le LSR est soit à jour ou soit que de nouvelles études pertinentes ont été identifiées et qu'une mise à jour est en attente) via <https://osf.io/vhy5p/>. La revue elle-même sera mise à jour avec une nouvelle publication évaluée par des pairs chaque fois que des données pertinentes nouvellement publiées sont susceptibles d'avoir un impact sur la conclusion ou les résultats de la dernière version de l'article. Le cadre décisionnel et l'incorporation de chaque recherche de preuves suivront les lignes directrices du PRISMA (« Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses ») impliquant quatre étapes – l'identification, la sélection, l'éligibilité et l'inclusion – pour l'examen des sources d'information et l'intégration des preuves [210, 211]. Ces étapes sont réalisées indépendamment par deux groupes d'investigateurs (NKK/ARA et ETK/NK) et leurs résultats recoupés pour garantir l'absence d'erreurs possibles ou pour résoudre par consensus les cas éventuels de discordance. La présente revue initie cette LSR.

Stratégie de recherche et identification des ressources

Sept bases de données (PubMed, Embase, Scopus, African Journal Online, African Index Medicus, Bioline et Web of Science) ont été scrutées à la recherche des articles publiés avant Août 2021 et ayant analysé les mutations des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques en RDC. La stratégie de recherche ayant été prédéfinie à cette fin, est présentée dans le **Tableau 5.1**. Aucun filtre n'a été appliqué sur la recherche documentaire afin d'assurer la plus large inclusion possible des documents potentiellement informatifs. Les listes bibliographiques contenues dans les revues antérieures ont été scrutées manuellement afin de servir de possibles sources pour des articles supplémentaires à considérer pour la revue.

Tableau 5.1. Stratégie utilisée pour la recherche des articles publiés et inclus dans l'étude

#1	(Malaria OR paludisme OR <i>Plasmodium</i>)
#2	("molecular marker" OR "marqueur moléculaire" OR <i>mdr1</i> OR <i>Pfmdr1</i> OR <i>Pfmdr2</i> OR <i>crt</i> OR <i>Pfcr</i> OR <i>kelch13</i> OR <i>Pfkelch13</i> OR K13 OR <i>dhfr</i> OR <i>Pfdhfr</i> OR <i>dhps</i> OR <i>Pfdhps</i> OR <i>Pfpm3</i> OR <i>Pfpm2</i> OR <i>Pfeyb</i> OR <i>Pfhe1</i>) AND (resistance OR resistance)
#3	("Democratic Republic of Congo" OR "République Démocratique du Congo" OR Zaïre OR Congo)
Search	#1 AND #2 AND #3

Critères de sélection des articles

Des critères d'inclusion et d'exclusion prédéfinis et structurés selon un cadre PICOS – c'est-à-dire « Population, Intervention, Comparator, Outcomes, and Study Designs » – (**Tableau 5.2**) avaient été utilisés pour évaluer l'éligibilité des études. Ainsi donc, les études éligibles étaient celles rapportant des données observationnelles originales sur des isolats collectés avant tout traitement antipaludique dans une enquête conduite sur un site amplement identifié en RDC. L'enquête devait avoir évalué au moins un isolat de *Plasmodium* pour le polymorphisme génétique d'un locus ayant été associé à la résistance aux

antipaludiques et dont les informations rapportées incluaient les proportions relatives de différents génotypes.

Lorsque les données d'une étude spécifique étaient utilisées dans des publications ultérieures, le processus d'inclusion ne capturait que les informations les plus récentes. Les éventuels articles rapportant des informations génétiques insuffisantes, les revues systématiques, les rapports de cas, les présentations de conférence, les résumés des conférences et les correspondances aux éditeurs ont été exclus. L'échelle de Newcastle-Ottawa (« Newcastle-Ottawa Scale », NOS) a été utilisée pour évaluer la qualité des articles sélectionnés sur base de trois critères de qualité: la représentativité des échantillons d'étude (coté sur un maximum d'une étoile), la taille de l'échantillon (coté sur un maximum d'une étoile) et le résultat de l'étude (coté sur un maximum de trois étoiles) [212]. Seuls les articles de qualité méthodologique jugée modérée (deux à trois étoiles sur le NOS) ou élevée (quatre à cinq étoiles sur le NOS) ont été considérés pour l'inclusion dans cette revue systématique.

Collecte et gestion des données

La collecte des données a été réalisée selon un processus structuré (recherche documentaire, évaluation et inclusion des ressources, validation et extraction des données). Les variables extraites des études comprenaient des informations générales sur l'article (auteurs, titre de l'étude, année de publication, emplacement géographique de l'étude), les caractéristiques de l'étude (conception de l'étude, période d'échantillonnage, temps de collecte pendant l'enquête, caractéristiques des participants, contexte, taille de l'échantillon et méthodes analytiques) et les informations relatives aux mutations (positions génétiques séquencées, allèles trouvés, nombre d'isolats séquencés et nombre d'isolats porteurs des allèles individuels). Les données inaccessibles dans les articles recueillis ont été sollicitées auprès des auteurs correspondants.

Tableau 5.2. Critères PICOS de sélection des articles

Paramètre	Critère d'inclusion	Critère d'exclusion
« Population »	Participants infectés par des parasites du <i>Plasmodium spp.</i> Prélevés en RDC et diagnostiqués par PCR	- Cas de paludisme exportés en dehors de la RDC ; - Échantillons dont l'origine géographique est imprécise ;
« Intervention »	Extraction d'ADN à partir d'échantillons sanguins avec <i>P. falciparum</i> détecté, suivie d'une amplification et de la détermination du génotype d'un des gènes suivants : <i>kelch13</i>, <i>mdr1</i>, <i>mdr2</i>, <i>crt</i>, <i>dhfr</i>, <i>dhps</i>, <i>pm3</i>, <i>pm2</i>, <i>cytb</i> et <i>nhe1</i>	Données inaccessibles sur les variations génétiques, les loci ou le nombre d'isolats
« Comparator »	Non applicable pour cette revue	Non applicable pour cette revue
« Outcomes »	Génotype sur au moins un locus situé sur un des gènes suivants : <i>kelch13</i>, <i>mdr1</i>, <i>mdr2</i>, <i>crt</i>, <i>dhfr</i>, <i>dhps</i>, <i>pm3</i>, <i>pm2</i>, <i>cytb</i> et <i>nhe1</i>	Données relatives à d'autres gènes
« Study Design »	Articles évalués par des pairs et publiés avant Août 2021 en tant qu'étude observationnelle ou essai clinique avec des données provenant d'isolats de <i>Plasmodium</i> nouvellement analysés	- Lettres, commentaires, résumés de conférence, présentations de conférence ; - Revue systématique et méta-analyses ; - Études fondées exclusivement sur des modèles animaux ; - Données relatives aux isolats de <i>Pf</i> génétiquement modifiés lors d'expériences en laboratoire.

Synthèse des données et évaluation du risque de biais

Une synthèse narrative des informations recueillies a été réalisée. Les fréquences absolues et relatives de chaque allèle retrouvé ont été résumées en utilisant les valeurs médianes et les intervalles interquartiles (IQR) correspondants au sein de chaque site géographique de collecte. Les données ont été géo-référencées et projetées sur des cartes géographiques. Une cartographie moléculaire des SNP du *PfK13* des isolats de *P. falciparum* originaires de la RDC a été construite en référence à la séquence de type sauvage *PF3D7_1343700*, disponible dans la base de données de protéines UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IDQ2>).

Ces cartographies spatiales et moléculaires ont permis de visualiser la distribution de différents génotypes rencontrés en RDC, y compris les mutations établies ou soupçonnées comme MMR du *Plasmodium* aux antipaludiques. Pour interpréter les tendances spatio-temporelles, les résultats ont été rapportés à l'échelle des enquêtes individuelles. Toutes les analyses et cartographies ont été réalisées dans l'environnement R [213] avec la mise à contribution des packages *ggplot2* [214], *ggmap* [139] et *rgdal* [140]. Le risque de biais a été minimisé en excluant les éventuelles études sur les cas de paludisme pouvant avoir été exportés hors de la RDC ainsi que les communications répétées des données. En plus, les critères NOS utilisés pour évaluer la qualité méthodologique des articles primaires permettaient de minimiser les risques de biais (biais de sélection, facteurs de confusion et biais de performance) dans les études prises en compte par la revue [134].

5.4. Résultats

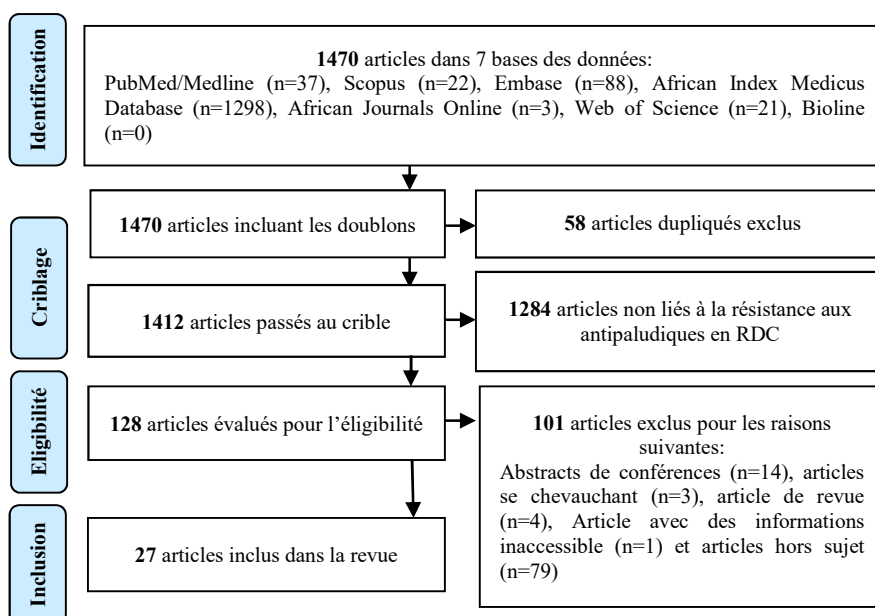


Figure 5.1. Diagramme PRISMA de la revue systématique.

Caractéristiques de base des études primaires

Au total, 1470 articles ont été colligés lors de la recherche documentaire à travers différentes bases de données. Aucune étude additionnelle n'a été obtenue par fouille manuelle. Après élimination de 58 articles dupliqués, 1412 publications ont été scrutés et dont 1385 se sont avérés inéligibles sur base de critères PICOS définies pour cette revue (**Figure 5.1**). Au final, 27 articles ayant analysé 12389 échantillons collectés sur divers sites en RDC de 2002 à 2020 (nombres médians : 180 [IQR : 753] échantillons et 1 [IQR : 3] site couvert par étude) ont été incluses dans cette revue (**Tableau S5.1**). Les provinces n'ayant pas fait l'objet d'investigations étaient surtout situées au nord et au centre du pays (**Figure S5.1**).

La résistance de *P. falciparum* aux 4-aminoquinoléines et amino-alcools en RDC

La résistance du paludisme aux 4-aminoquinoléines est attribuée à des altérations des gènes divers [7]. Dans cette revue, au total 1555 isolats de *P. falciparum* collectés entre 2002 et 2020 avaient été analysés à la recherche de la mutation K76T du gène *PF3D7_0709000* du chromosome 7 et codant pour la protéine *PfCRT* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter). Il ressort de ces analyses une fréquence médiane de 32,1% [IQR : 48,8] de la mutation *PfCRT* K76T sur les sites ayant été enquêtés dans le pays (**Figure 5.2**). Une diminution globale de la fréquence de cette mutation a été notée, passant d'une médiane de 92,9% [IQR: 0,0] parasites porteurs de la mutation par enquête en 2002 à une médiane de 10,3% [IQR: 24,0] en 2019-2020. Toutefois, d'importantes variations de cette fréquence restaient observables d'un site à l'autre au cours des deux dernières années, allant parfois de 1.8 à 89.5% au cours de la même enquête [205, 215].

La **Figure 5.3** présente les haplotypes rencontrés sur les codons 72, 73, 74, 75 et 76 de la protéine *PfCRT* des parasites isolés en RDC. Il apparaît ainsi que la majorité d'isolats présentait un haplotype CVMNK dit de type sauvage (67,9%

[IQR : 50,0]). L'haplotype lié à la *PfCQ-R* le plus fréquent était le CVIET, observé dans une proportion médiane de 32,1% [IQR : 49,7] d'isolats par site enquêté et rapporté pratiquement sur tous les sites enquêtés. Les autres haplotypes pouvant être à l'origine de la *PfCQ-R* étaient beaucoup plus rares avec une fréquence médiane <1% par site enquêté. Il s'agissait notamment des haplotypes CVMDK, CVMET, CVIKT, GVIET, CVINT, et CVMNT. Par ailleurs, le gène *PF3D7_0523000* (situé sur le chromosome 5) codant pour la protéine *PfMDR1* (« *Plasmodium falciparum* multidrug drug resistance 1 ») et pouvant être impliqué également dans la *PfCQ-R* avait fait l'objet d'analyses au cours de deux enquêtes conduites à Kinshasa [216, 217]. Les SNP du *PfMDR1* rapportés incluaient N86Y (64,4% [IQR : 2,31]), D1246Y (57,0% [IQR : 33,7]), et Y184F (47,3 % [IQR : 12,0]) alors que S1034C et N1042D n'avaient pu être observés (**Figure S5.2**).

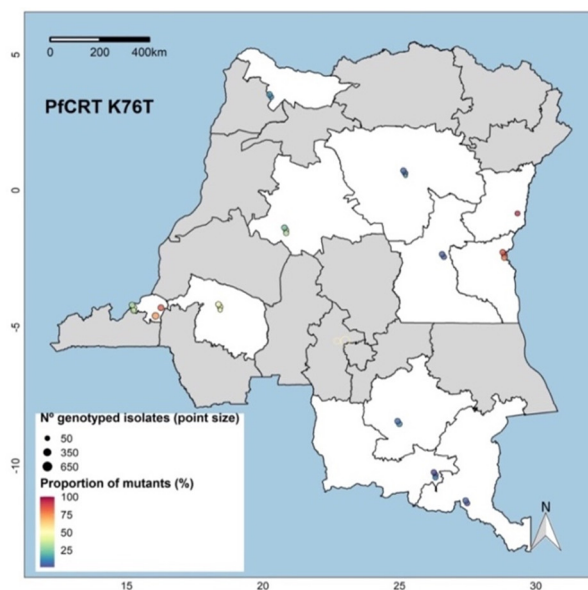


Figure 5.2. Distribution géographique des parasites porteurs de la mutation *PfCRT* K76T en RDC.

Chaque enquête ayant analysé la mutation *PfCRT* K76T a été géo-référencée et projetée sur cette carte. Les aires non ombrées représentent les provinces où des études sur la mutation *PfCRT* K76T ont été conduites et celles ombrées, les provinces où aucune enquête n'a été

conduite. Les cercles représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel à la taille de l'échantillon d'isolats ayant été séquencés avec succès pour le gène *PfCRT* en lien avec la résistance à la CQ. Les palettes de couleurs reflètent la fréquence relative de la mutation *PfCRT* K76T au cours des enquêtes individuelles.

L'haplotype SVMNT du *PfCRT* (ou allèle 7G8), mise en cause dans la résistance à l'AQ (*PfAQ-R*), n'avait pas été rapporté à travers le pays. Par contre, la mutation *PfMDR1* N86Y, soupçonnée de *PfAQ-R*, était fréquente (64,4% d'isolats par site enquêté ; 2 enquêtes). La résistance à la PIP (*PfPIP-R*) pouvant être liée à d'autres mutations du *PfCRT* (T93S, H97Y, F145I, I218F, C350R, T93S, H97Y, F145I, I218F, M343L et G353V) ou à une augmentation du nombre des copies des gènes *PF3D7_1408000* et *PF3D7_1408100* encodant deux protéases du *Plasmodium*, la plasmepsin 2 (*PfPM2*) et la plasmepsin 3 (*PfPM3*) [218-220], n'avait pas été explorées au cours des études analysées.

Des mutations ci-haut rapportées à des fréquences parfois élevées sur les séquences de *PfCRT* (K76T) et de *PfMDR1* (D1246Y) (**Figure S5.2**) sont soupçonnées dans la résistance à la QN (*PfQN-R*) [7]. La *PfQN-R* est également soupçonnée comme étant liée à une augmentation du nombre des copies du gène codant pour une autre protéine membranaire, le *PfMDR2* [221]. Seuls deux isolats collectés à Kinshasa ont été explorés et se sont révélés comme étant dépourvus d'une quelconque altération du nombre des copies de *PfMDR2* [216]. La résistance à la L (*PfL-R*) est soupçonnée également comme pouvant être liée à des mutations du *PfMDR1* (ex. N86Y et Y184F) retrouvées à Kinshasa dans cette revue [7]. A l'opposé, des MMR suggérant une résistance à la MQ (*PfMQ-R*) n'avaient pas été observés. En effet, deux études ayant analysé 366 isolats collectés de 2014 à 2019 sur 7 sites, soit un total de 52,3 isolats par enquête, n'avaient détecté aucune amplification du nombre des copies du gène *Pfmdr1* validée comme un marqueur de la *PfMQ-R* (**Figure S5.2**) [7]. Dans la même lancée, une étude ayant analysé deux isolats n'avait pas détecté une amplification du nombre des copies du gène *Pfmdr2*, une altération génétique incriminée également dans la *PfMQ-R* [221].

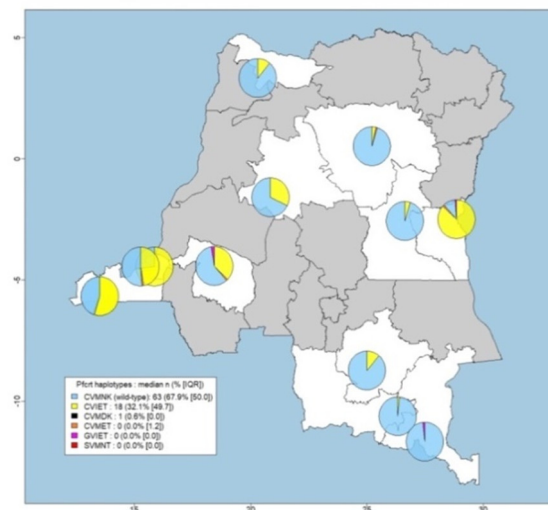


Figure 5.3. Distribution de différents haplotypes répertoriés du 72^{ème} au 76^{ème} codon du *PfCRT* en RDC.

Les camemberts affichés sur cette carte représentent les proportions d'isolats arborant chacun des haplotypes observés sur les codons 72 à 76 du *PfCRT* au cours de différentes enquêtes menées en RDC.

Résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine (ART) et ses dérivés en RDC

La résistance de *P. falciparum* à l'ART et ses dérivées (*PfART-R*) est actuellement attribuée à des mutations spécifiques du gène du *PfK13*, situé sur le chromosome 13 [1, 78, 105]. Au cours de cette revue, 10 des articles inclus avaient analysé le polymorphisme du *PfK13* de 5137 isolats de *P. falciparum* collectés entre 2006 et 2020 (**Tableau S5.3**). La grande majorité d'isolats examinés ($n=4779$, soit 98,8% [IQR : 1.85] d'isolats enquêtés) avait une séquence conservée du *PfK13*. Les isolats restants (1.2% [IQR : 1.0]) avaient une séquence de *PfK13* portant au moins une mutation NS de type substitution faux-sens. Les proportions relatives d'isolats porteurs de mutations NS du *PfK13* ne semblaient pas changer substantiellement au cours des années couvertes par cette revue (**Figure S5.3**). Au total, 33 types différents de mutations NS ont été rencontrés sur les 285 loci constitutifs du domaine de l'hélice de *PfK13*.

Quatre mutations avaient été détectées hors domaine de l'hélice (K189T, R225K, T149S et K92N) mais n'avaient pu être recherchées que dans l'unique étude par Miotto et al. ayant séquencé l'entièreté du gène [171]. La mutation ayant eu la fréquence relative la plus élevée sur un site de collecte était la K189T (12,7% des 79 isolats analysés pour le génotype de K189). En deuxième position venait la mutation A557S (6,9% des 287 isolats analysés pour le locus A557). Un lot de sept mutations observées à des proportions ne dépassant pas les 2% par enquête survenait sur des loci connus ou suspectés d'avoir un rôle dans l'émergence de la *PfART-R* (**Figure 5.4**). Ces mutations incluaient une mutation validée pour la *PfART-R* (R561H), cinq mutations mimant des mutations validées ou associées à la *PfART-R* (M476K mimant M476I, G538S mimant G538V, V568M mimant V568G et D584E/G mimant D584V) ainsi qu'une mutation (S522C) dont les soupçons initiaux d'association à la *PfART-R* avaient pu être exclus cliniquement et expérimentalement [78]. Toutes les mutations restant du *PfK13* avaient une fonction biologique non encore explorée (**Tableau S5.1**).

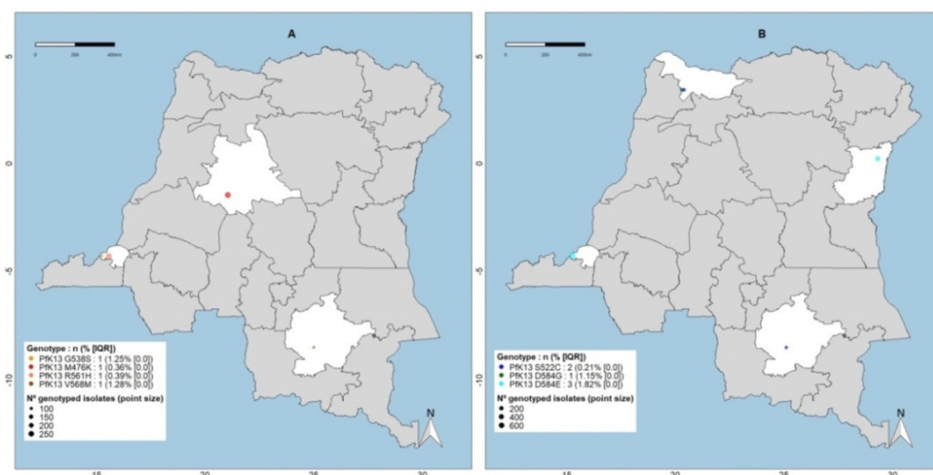


Figure 5.4. Fréquence et distribution géographique des parasites du *Plasmodium* porteurs des mutations du *PfK13* potentiellement liées à la *PfART-R* en RDC.

Chaque cercle projeté sur les cartes A et B reflète une enquête ayant rapporté au moins une mutation sur un locus connu ou suspecté d'avoir un rôle dans l'émergence de la *PfART-R*. Le diamètre des cercles est proportionnel à la taille de l'échantillon d'isolats ayant été

séquencés avec succès pour le gène *PfK13*. Les mutations sont présentées avec la fréquence relative médiane et l'intervalle interquartile à travers différents sites d'enquête. Pour éviter la superposition des points projetés sur certains sites, les enquêtes ont été présentées sur deux cartes séparées.

Résistance de *P. falciparum* aux antifolates en RDC

La résistance de *P. falciparum* à la combinaison Sulfadoxine-pyriméthamine (*PfSP-R*) est due à l'accumulation d'une série de mutations génétiques dans les gènes de la dihydrofolate réductase (*PfDHFR*) et de la dihydroptéroate synthase (*PfDHPS*) [222-224]. Six articles inclus dans cette revue et ayant collecté 3731 isolats de 2002 à 2020 ont analysé cinq codons (C50, N51, C59, S108, I164) de *PfDHFR* pouvant être impliqués dans la *PfSP-R*.

Des quatre mutations différentes observées (N51I, C59R, S108N, I164L), les plus fréquentes étaient : S108N (99,5 % [IQR : 0,8]) et N51I (97,9% [IQR : 13,1]). En parallèle, neuf articles ayant analysé six codons différents de *PfDHPS* (I431, S436, A437, K540, A581 et A613) sur 4045 isolats collectés de 2002 à 2020 avaient relevé six mutations différentes (I431V, S436A, A437G, K540E, A581G et A613S). Parmi ces dernières, la plus fréquente mutation était *PfDHPS* A437G (97,7% [IQR : 21,6] d'isolats par site enquêté) qui prévalait plus dans l'Ouest du pays (**Figure 5.5**). Ensuite venait la mutation *PfDHPS* K540E retrouvée à une fréquence médiane de 45,2% [IQR : 51,6] d'isolats par site enquêté avec les plus fortes prévalences dans l'Est du pays (**Figure 5.5**). Cinq de ces articles avaient analysé conjointement les allèles N51, C59 et S108 de *PfDHFR* ainsi que A437 et K540 de *PfDHPS* sur 2828 isolats collectés de 2002 à 2020. Globalement, quinze haplotypes *PfDHFR-PfDHPS* différents accumulés parmi les parasites isolés en RDC avait été observés.

Dans l'absolu, les deux haplotypes les plus fréquents étaient des mutants quadruples et quintuples : IRN-GK (34,6% ; n=1018) et IRN-GE (10,6% ; n=311), dont les prévalences les plus élevées se profilaient dans l'Est du pays. Au reste, certaines des mutations du *PfDHFR* (ex. A16V, N51I, C59R, S108N/T and I164L) [7] permettent également d'entrevoir la résistance du *Plasmodium* à un autre

antifolate non utilisé comme antipaludique en RDC, le proguanil (PRO). Ainsi, la résistance à la PRO (*Pf*PRO-R) pourrait être liée aux mutations N51I, C59R et S108N ayant des prévalences élevées de façon presque ubiquitaire en RDC, contrairement à la mutation I164L restée quasi-inexistante (0,0% [IQR : 0,1]) (Figure 5.6).

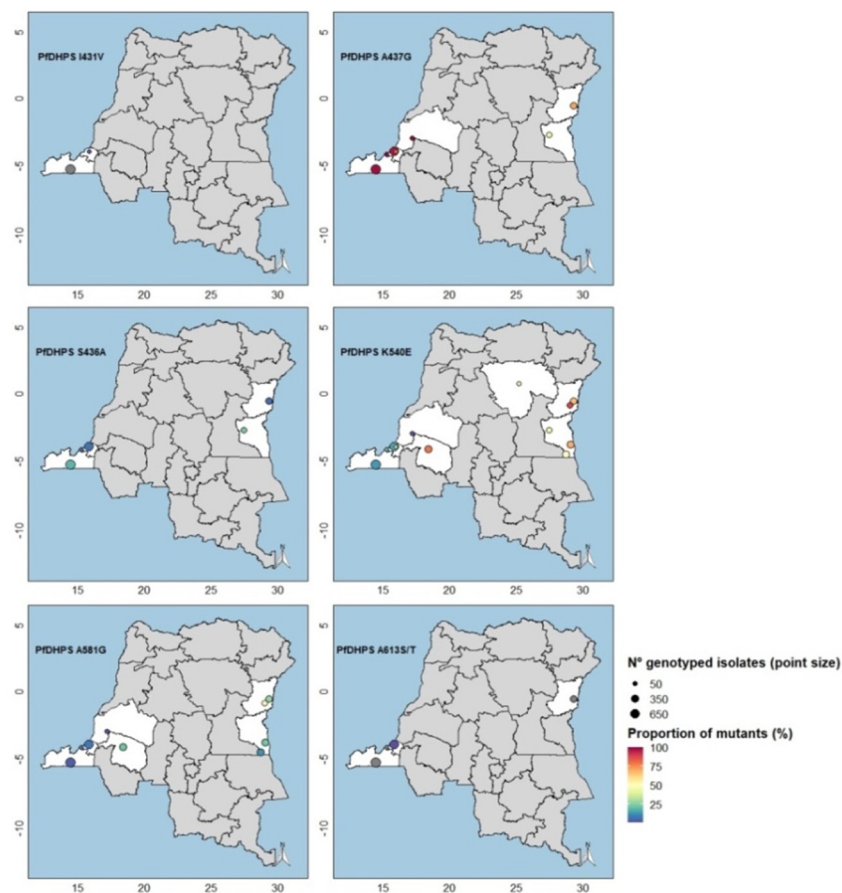


Figure 5.5. Fréquence et distribution géographique des parasites du *P. falciparum* porteurs des mutations de la *Pf*DHPS en RDC.

Les enquêtes ayant analysé chacune des mutations de la *Pf*DHPS ont été projetées sur ces cartes. Le diamètre de chaque cercle est proportionnel à la taille de l'échantillon d'isolats ayant été séquencés avec succès pour le gène de la *Pf*DHPS. Les palettes de couleurs reflètent la fréquence relative de chaque mutation *Pf*DHPS au cours des enquêtes individuelles.

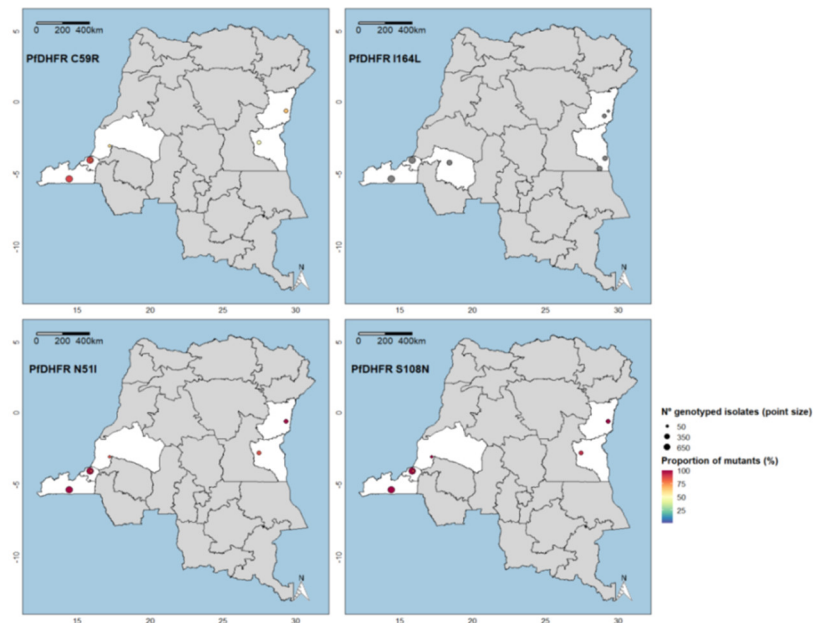


Figure 5.6. Fréquence et distribution géographique des parasites du *P. falciparum* porteurs de mutations de la *PfDHFR* en RDC.

Les enquêtes ayant analysé chacune des mutations de la *PfDHFR* ont été projetées sur ces cartes. Le diamètre de chaque cercle est proportionnel à la taille de l'échantillon d'isolats ayant été séquencés avec succès pour le gène de la *PfDHFR*. Les palettes de couleurs reflètent la fréquence relative de chaque mutation *PfDHFR* au cours des enquêtes individuelles.

5.5. Discussion

Cette revue résume les résultats des études sur le paludisme pharmaco-résistant en RDC pendant les dix-huit dernières années. Le nombre d'études incluses (27 études) est resté minime au regard du niveau élevé d'endémicité palustre ainsi que de l'importante étendue et de la grande taille de la population du pays. La résistance recherchée était relative aux dérivées quinoléines, à l'ART et ses dérivées et aux inhibiteurs des acides nucléiques ; ce sont les familles des molécules antipaludiques ayant été historiquement employées pour le traitement curatif ou préventif du paludisme dans le pays [5, 23].

La résistance aux 4-aminoquinoléines (ex. CQ, AQ et PIP) était dominée en RDC par la *PfCQ-R*, restée globalement élevée (un parasite sur trois) quoi qu'en nette diminution par rapport aux années précédentes. Cette résistance attribuable à la mutation *PfCRT* K76T (et à des mutations du *PfMDR1*), avait principalement en toile de fond l'haplotype CVIET, un stigmate persistant d'une chloroquino-résistance importée essentiellement d'Asie du Sud-Est via l'Afrique de l'Est vers les années 1970 [53-56]. L'augmentation progressive de la fréquence de l'allèle *PfCRT* de type sauvage ou haplotype ancestral (CVMNK) notée en parallèle de la diminution de l'allèle K76T par rapport aux valeurs de base des années 2002, suggère une diminution globale de la *PfCQ-R* dans le pays. Elle pourrait être liée à la baisse de la pression médicamenteuse ayant fait suite au retrait de la CQ de l'utilisation comme antipaludique vers les années 2000 [55, 225]. Une tendance similaire est observable dans les populations de nombreuses régions d'Afrique [225]. Néanmoins, à l'échelle infranationale, d'importantes variations allant de l'ordre de 1% à plus de 80% de *PfCQ-R* demeuraient perceptibles encore au cours de ces deux dernières années [205]. Il est donc possible que l'usage de la CQ dans certaines régions ait persisté longtemps après son retrait officiel de la pratique clinique. Il est également possible qu'une fixation des mutants *PfCRT* dans la population de certains sites pourrait avoir eu lieu avant le retrait du médicament. Des investigations devraient être menées pour apporter de la clarté sur cette question. Dans tous les cas, ce résultat tend à s'opposer à la perspective d'une possible réintroduction à court terme de cet antipaludique dans son usage clinique classique à travers le pays. Même à plus long terme, toute décision de ce genre, devrait tenir compte de la variabilité géographique observée. Plus encore, la reprise de l'utilisation massive de la CQ et ses dérivés dans le contexte de la récente pandémie de la maladie à coronavirus 2019 (COVID19) risque de venir relancer à la hausse la prévalence de la *PfCQ-R* dans le pays [206]. Il est urgent que des mesures soient mises sur pied pour encadrer cette utilisation de la CQ et ses dérivés dans les limites des évidences médicales et à la lumière des bonnes pratiques

cliniques. Plus que jamais, la surveillance des parasites chloroquino-résistants mérite d'être poursuivie mais aussi d'être étendue à bien d'autres sites restés inexplorés à ce jour. Bien que l'haplotype SVMNT de *PfCRT* (ou allèle 7G8) lié à la *PfAQ-R* [54] n'ait jamais été rapporté à travers le pays, la fréquence de l'allèle *PfMDR1* N86Y sur un fond d'haplotype CVIET peut faire soupçonner l'existence de la *PfAQ-R* dans le pays [7]. Des études ultérieures sont nécessaires pour trancher cette question et évaluer l'extension possible de cette résistance en explorant un plus grand nombre de sites. La *PfPIP-R*, par contre, reste largement méconnue dans le pays étant donné que les altérations génétiques en cause [218-220] n'ont pas été explorées. D'autre part, des mutations trouvées sur les séquences du *PfCRT* et du *PfMDR1* pourraient faire également suspecter la présence de parasites résistants à la QN et à la L à Kinshasa notamment [217, 226]. Par contre, l'absence de parasites ayant une amplification des copies des gènes de *PfMDR1* et de *PfMDR2* suggère de façon consistante que la *PfMQ-R* n'a probablement pas encore émergé dans le pays [205, 215, 227]. Cependant, la résistance du *Plasmodium* aux amino-alcools (ex. QN, MQ et L) étant globalement plus rare et peu étudiée comparativement à celle aux 4-aminoquinoléines, est restée également peu explorée en RDC. Au demeurant, il n'existe pas toujours de MMR définitivement validés pour la *PfQN-R* et la *PfL-R* [7]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir apporter plus de lumière sur l'épidémiologie de cette résistance aux amino-alcools en RDC.

Cette revue a établi une carte génétique des SNP de la séquence du *PfK13* pouvant servir de référence pour la surveillance de la *PfART-R* en RDC. Cette carte génétique a révélé que la grande majorité des SNP du domaine de l'hélice de *PfK13* observée dans le pays (31 sur 33) n'a pas encore été explorée et ne saurait être définitivement épargnée de tout soupçon de *PfART-R*. En effet, parmi ces SNP, seule la mutation S522C a été analysée et amplement démontrée comme ne jouant aucun rôle dans la résistance [78]. A l'opposée, la mutation R561H observée sur un seul parasite isolé en 2014 est un marqueur validé expérimentalement et

cliniquement pour la *Pf*ART-R [1, 78]. Les parasites porteurs de cette mutation devraient susciter une attention spéciale dans la sous-région en raison de leur émergence et diffusion rapides observées depuis 2018 au Rwanda, un des pays limitrophes de la RDC [14, 73, 81]. Par ailleurs, les premiers cas africains d'échecs cliniques à l'ART attribués au paludisme par des parasites porteurs des mutations A675V et C469Y (également déjà validées comme marqueurs de la résistance à l'ART en Asie) ont été observés au cours d'un essai clinique conduit en 2017 en Ouganda, un autre pays voisin de la RDC [83]. Ces observations ont ainsi confirmé l'émergence effective de la résistance à l'ART en Afrique, dans la Région des Grands Lacs, renforçant la nécessité urgente de surveiller et mettre en place des mécanismes de contention contre les parasites résistants à l'ART en RDC. Spécialement dans la partie Est du pays, en sus d'un renforcement des mesures antipaludiques générales, une surveillance et un dépistage des populations migrantes seraient souhaitable pour contrer l'expansion éventuelle des parasites pharmaco-résistants au même titre qu'un diagnostic ciblé et un traitement des populations aux frontières des pays limitrophes. Au reste, cinq des SNP du domaine de l'hélice du *Pf*K13 répertoriés en RDC avaient une structure rappelant des mutations antérieurement liées à la *Pf*ART-R (M476K mimant M476I, G538S mimant G538V, V568M mimant V568G et D584E/G mimant D584V) et pourrait logiquement être soupçonnées d'entraîner une *Pf*ART-R. Ces mutations devraient également attirer une attention en considérant que les parasites africains, y compris ceux de la RDC, pourraient avoir leur préférence génétique propre pour faire émerger la *Pf*ART-R sans nécessairement impliquer les mutations antérieurement décrites en Asie [128, 228]. Néanmoins, ces mutations détectées en RDC dans le domaine de l'hélice du *Pf*K13 avaient une fréquence relative faible (<2%) au cours de différentes enquêtes menées. Ceci suggère qu'il est possible que des parasites résistants apparaissent sporadiquement ou circulent à basses fréquences sans être sélectionnés à travers le pays. Ce profil moléculaire du *Pf*K13 en RDC est superposable à celui observé dans toute l'Afrique sub-saharienne et diffère

largement de celui noté en Asie du Sud-Est où la *Pf*ART-R se développe depuis les années 2008 [14, 15, 78, 105]. Une explication plausible à cette divergence épidémiologique entre l'Asie et l'Afrique pourrait être l'introduction plus récente (autour des années 2000) des dérivés d'ART à large échelle dans les pays africains [14]. L'émergence de la *Pf*ART-R en RDC ne pourrait être donc plus qu'une question de temps alors que l'émergence locale des variants structurellement différents de celles observés sous d'autres cieux reste possible [14, 78]. Par ailleurs, les essais cliniques évaluant l'ART et ses dérivés en RDC ont régulièrement rapporté des cas d'échecs thérapeutiques [229-231]. La résistance pourrait en être l'une des causes possibles à côté par exemple de problèmes d'observance thérapeutique ou des réinfections plasmodiales [88]. Malgré le fait que la clairance clinique des parasites y compris ceux résistants à l'ART pourrait être encore maintenue notamment grâce à l'effet synergique de l'immunité acquise contre le paludisme chez les africains [232], les observations faites dans cette étude sont une source d'inquiétude pour l'avenir de l'ART et ses dérivés en RDC. D'où la nécessité urgente d'une surveillance plus étroite et plus étendue des parasites porteurs de mutations du *Pf*K13 circulant dans la population en Afrique en général et en RDC en particulier. Finalement, il est possible que des mutations pertinentes pour la résistance aux antipaludiques mais situées en dehors du domaine de l'hélice du *Pf*K13 aient été passées inaperçues car elles n'ont pas été recherchées au cours des études conduites. Il s'agit notamment des mutations découvertes récemment dans le domaine BTB/POZ du *Pf*K13 (ex. P413A) [233] ou même situées d'autres gènes qui suggèrent qu'une résistance non liée au domaine de l'hélice du *Pf*K13 peut également émerger de manière indépendante dans les conditions naturelles en Afrique [128, 228]. Bien que les mutations du domaine de l'hélice du *Pf*K13 occupent une place importante dans la surveillance de l'émergence de la *Pf*ART-R, ces nouvelles mutations devraient être intégrées dans les enquêtes futures. Pour le reste, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier de gènes additionnels pouvant être liés également à cette résistance.

La *Pf*SP-R résulte d'une accumulation progressive des mutations spécifiques sur les séquences des protéines *Pf*DHFR et *Pf*DHPS, notamment N51I, C59R, S108N et I164L sur la *Pf*DHFR ainsi que I431V, S436A/F, A437G, K540E, A581G et A613T/S sur la *Pf*DHPS [7, 234]. Cette revue a montré que presque tous les isolats ayant été analysés en RDC portaient au moins un de ces marqueurs moléculaires de la *Pf*SP-R et les plus fréquents marqueurs étaient N51I et S108N sur *Pf*DHFR (>95% d'isolats) ainsi que A437G sur *Pf*DHPS (97,7% d'isolats). Ce profil est en cohérence avec celui observé dans d'autres pays de la même région [234]. Le niveau de la *Pf*SP-R d'une région est stratifié en faible, modéré et élevé si les isolats parasitaires remplissent respectivement les critères suivants : *Pf*DHPS A437G < 90 % ou *Pf*DHPS K540E < 30 %, *Pf*DHPS A437G ≥ 90 % ou *Pf*DHPS K540E ≥ 30% et <90 % ; et *Pf*DHPS K540E ≥ 90% [234].

Le profil des parasites observé en RDC permet ainsi de conclure que la *Pf*SP-R y est de niveau modéré étant donné que la prévalence médiane des mutations *Pf*DHPS A437G et *Pf*DHPS K540E était respectivement de 97,7% et 50% sur les différents sites enquêtés. Il est apparu que la prévalence de ces mutations n'affichait pas une tendance à diminuer avec le temps dans le pays. Ceci suggère que le retrait de S-P du traitement curatif de première ligne dans les années 2005, ne semble pas avoir eu l'effet d'inversion de la résistance initialement escomptée [25, 34]. De surcroît, il est apparu que près d'un parasite sur dix était un des mutants quintuples de profil génétique IRN-GE qui prédominaient nettement dans l'Est du pays. Ce profil épidémiologique est similaire à celui rapporté dans plusieurs pays africains où une tendance à l'augmentation de la prévalence des mutants quintuples est reconnue en allant des régions d'Ouest vers l'Est du continent [61, 223, 234]. Ces mutants doivent attirer l'attention des décideurs politico-sanitaires et des chercheurs car ils offrent un fond génétique propice à l'émergence de mutants plus complexes et dotés d'un niveau plus élevé de résistance à la S-P (ex. IRN-GEG, IRNI-VAGKGS) [234-237]. Des mesures de santé publique proactives devraient être urgemment implémentées afin de contenir

cette tendance et de retarder le déclin inéluctable de l'efficacité thérapeutique de la S-P. En tout état de cause, le niveau de résistance à la S-P qui se profile en RDC pourrait avoir des implications différentes pour les décisions ayant trait à l'administration de la S-P pour le traitement préventif intermittent du paludisme pendant la grossesse (TPIg) ou chez l'enfant (TPIe). En effet, à un niveau de résistance modéré, l'administration de la S-P comme TPIg préserve encore des bénéfices en termes de réduction du risque relatif du faible poids de naissance [234]. Cette efficacité de la S-P serait attribuée à ses effets pharmacologiques additionnels en tant qu'antibiotique et immuno-modulateur [238-242]. Il est donc très probable que le TPIg-SP conserve son efficacité et resterait donc indiqué dans la population congolaise. Par contre, en dépit de cette efficacité relative, il est évident que la S-P n'est plus assez efficace pour éliminer les parasites du paludisme chez la femme enceinte en RDC [207, 234]. Par conséquent, au lieu d'utiliser de manière isolée la S-P comme TPIg, il serait envisageable de combiner la S-P pour ses avantages non paludiques avec des molécules partenaires capables d'améliorer les effets antipaludiques (par exemple, la dihydroartémisinine, DHA) ; cette option mérite de faire l'objet d'études futures [242]. A l'opposé, le TPIe-SP envisagé depuis 2014 dans les régions en proie au paludisme saisonnier en RDC [23], pourrait ne pas être finalement encouragé à la lumière des résultats de cette revue car l'OMS restreint son indication aux régions ayant une prévalence de la mutation *PfDHPS* K540E < 50% [243]. Des études seront nécessaires pour rechercher des alternatives à la S-P pour le TPIe.

Cette revue systématique a comporté plusieurs limites. Premièrement, plusieurs régions géographiques de ce vaste pays étaient sous-représentées dans les enquêtes ayant été menées (ex. les provinces du centre et du nord du pays). Des études futures devraient venir combler cette insuffisance. Deuxièmement, il existait une grande hétérogénéité méthodologique des études primaires en termes de conception, de méthodes de collecte et d'approches analytiques utilisées. Associés au petit nombre d'études inclus (seulement 27 articles, tous antipaludiques

confondus), ces facteurs n'ont pas permis de résumer les données au moyen d'une méta-analyse standard. La revue s'est ainsi limitée à faire une synthèse narrative des observations.

5.6. Conclusion

Malgré ces limites, la présente étude montre que le paludisme pharmaco-résistant constitue un problème majeur de santé publique en RDC. La surveillance de ce paludisme est un maillon important pour améliorer la situation épidémiologique. Les résultats présentés constituent une base importante devant servir de référence pour cette surveillance. Une actualisation continue de cette revue contribuera à guider, de façon hiérarchisée et adaptée, les efforts de santé publique nécessaires pour une bonne gestion du paludisme dans le deuxième pays le plus affecté au monde.

Contribution des auteurs

NS et NKK ont conçu l'étude. NKK, ETK, ARA et NK ont rédigé le protocole, effectué la recherche documentaire, l'acquisition des données agrégées, l'examen des articles primaires et l'extraction des données. NKK et ETK ont analysé les données et établi des résumés. NKK, ETK, ARA et NK ont rédigé la première ébauche du manuscrit. YK a fourni un accès aux ressources documentaires sur la base des données Embase. DYM, BD, PKZ, PDM, GML, MPH, DMM, YK, AK, YN, PLD et NS ont révisé la première ébauche du manuscrit. Tous les auteurs ont fourni une contribution conceptuelle, révisé et approuvé la version finale du manuscrit.

Remerciements

Cette revue systématique a été financée par l'Agence Belge de Coopération à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES).

Accessibilité des données

Les données supplémentaires plus détaillées sont accessibles sur :
<https://osf.io/vhy5p/>.

CHAPITRE 6. EVALUATION DE L'UTILITE DU TRAITEMENT PREVENTIF INTERMITTENT DU PALUDISME PENDANT LA GROSSESSE PAR SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE DANS UN CONTEXTE DE RESISTANCE ACCRUE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A L'HOPITAL DE KINGASANI A KINSHASA EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

Auteurs : Nadine Kayiba Kalenda, Doudou Malekita Yobi, Vanessa Rodanis Tchakounang Kouoneyou, Dieudonné Makaba Mvumbi, Pius Zakayi Kabututu, Brecht Devleesschauwer, Erick Mukomena Sompwe, Patrick DeMol, Marie-Pierre Hayette, Georges Lelo Mvumbi, Angel Rosas-Aguirre, Paul Lusamba Dikassa, Niko Speybroeck.

Article: Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kingasani Hospital, Kinshasa in the Democratic Republic of Congo. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul 18;94 :105009.

Lien: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>

6.1. Résumé

Contexte : La résistance croissante de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) menace son utilité pour le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg-SP). Les effets prophylactiques du TPIg-SP sur le paludisme maternel et les issues indésirables de la grossesse ont été évalués à l'hôpital de Kingasani à Kinshasa en République Démocratique du Congo (RDC).

Méthodes : Les parturientes (n=844) et leurs nouveau-nés respectifs ont été étudiés. Des échantillons de sang prélevés sur des femmes ont été testés pour le paludisme à l'aide d'un test de diagnostic rapide (TDR) et d'un examen de frottis sanguin. Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'analyseur HemoCue®. Une

analyse par la technique de PCR-RFLP a été utilisée pour détecter les mutations N51I, C59R et S108N de la *Pf*DHFR ainsi que les mutations A437G et K540E de la *Pf*DHPS du *P. falciparum*. Des modèles de régression logistique ont permis d'évaluer la relation entre la prise du TPIg-SP et les issues cliniques de la grossesse.

Résultats : Le paludisme à *P. falciparum* a été détecté à l'accouchement chez 10,8 % des femmes et était statistiquement associé à de la fièvre pendant la grossesse (OR=2,9 [1,5 ; 6,3] ; $p=0,004$) et à une anémie maternelle (OR=3,9 [2,4 ; 6,3] ; $p<0,001$). Un parasite sur cinq était un quintuple mutant encodant simultanément les mutations N51I, C59R et S108N de la *Pf*DHFR ainsi que les mutations A437G et K540E de la *Pf*DHPS. Le profil moléculaire des parasites (32,6% des parasites porteurs de *Pf*DHPS K540E) suggérait un niveau modéré de résistance à la S-P. La prise du TPIg-SP n'était pas associée à une réduction du paludisme maternel, de la fièvre signalée pendant la grossesse ou des décès fœtaux ($p> 0,05$). Inversement, trois doses ou plus de S-P ont été associées à une diminution significative des issues cliniques indésirables de la grossesse dont notamment une anémie maternelle (OR=0,4 [0,2 ; 0,9] ; $p=0,024$), une gestation raccourcie (OR=0,4 [0,2 ; 0,8] ; $p=0,009$) et un faible poids à la naissance du nouveau-né (OR=0,2 [0,1 ; 0,5] ; $p<0,001$).

Conclusion : Le TPIg-SP n'était pas associé à une réduction du paludisme maternel dans notre étude, mais préservait son effet prophylactique contre les issues cliniques indésirables de la grossesse. Pour contrer une perte supplémentaire d'effets cliniques du TPIg-SP dans la population étudiée, des stratégies alternatives capables d'améliorer son efficacité antipaludique (par exemple, la combinaison de la S-P avec des molécules partenaires) doivent être mises en œuvre.

Mots-clés : Paludisme ; La résistance ; Traitement préventif intermittent pendant la grossesse ; sulfadoxine-pyriméthamine ; Parturiente ; République Démocratique du Congo.

6.2. Introduction

En République démocratique du Congo (RDC), environ 1,5 million de femmes enceintes sont exposées chaque année au paludisme à *P. falciparum* [244]. Cette infection peut avoir de graves conséquences à la fois pour la mère et l'enfant à naître, notamment une anémie maternelle, un retard de croissance intra-utérine, un faible poids à la naissance (FPN), un accouchement prématuré, la mort fœtale et le paludisme congénital [222, 245]. Pour éviter ces complications, depuis 2003, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), à la suite des directives de l'OMS, recommande entre autres interventions, le recours à un traitement préventif intermittent du paludisme à base de la S-P pendant la grossesse (TPIg-SP) [22, 246]. Pour ce faire, un minimum de trois doses de S-P est requis, comprenant une dose à chaque visite programmée pour consultation prénatale (CPN) et à partir du deuxième trimestre de la grossesse [247].

Les effets cliniques escomptés du TPIg-SP sont essentiellement une réduction importante de l'anémie maternelle, du FPN et de la mortalité néonatale tout en éliminant les infections à *P. falciparum* existantes chez les femmes enceintes [247-250]. Cependant, la résistance des parasites de *P. falciparum* à la S-P (*Pf*SP-R) apparue dans le pays depuis plus de vingt ans, constitue une menace majeure pour l'efficacité de la stratégie [222, 224, 234, 237, 251, 252]. Cette *Pf*SP-R est due à une série de mutations génétiques dans les gènes de la dihydrofolate réductase (*Pf*DHFR) et de la dihydroptéroate synthase (*Pf*DHPS) du parasite [222-224]. Les cinq mutations les plus courantes comprennent les substitutions N51I, C59R et S108N sur la *Pf*DHFR et les substitutions A437G et K540E sur la *Pf*DHPS [7, 234]. Les quintuples mutants définis comme étant les parasites de *P. falciparum* qui arborent une combinaison de ces cinq mutations ont été largement signalés en Afrique subsaharienne, y compris en RDC [236, 253]. Au niveau écologique, une prévalence élevée de ces quintuples mutants compromet considérablement

l'efficacité du TPIg-SP [20, 246]. Selon des rapports récents, une propagation plus importante de cette résistance est attendue du fait de l'utilisation continue de la S-P, avec comme corolaires possibles des résultats davantage médiocres du TPIg-SP [234, 237]. En conséquence, il est nécessaire non seulement de surveiller en permanence cette résistance, mais également d'évaluer la pertinence clinique de l'utilisation du TPIg-SP au niveau local afin d'éclairer les décisions en matière de politique antipaludique dans le pays. C'est dans cette optique que la présente étude a inclus les parturientes reçues à l'hôpital de Kingasani en RDC et leurs nouveau-nés respectifs, afin d'évaluer l'apport du TPIg-SP par rapport à la prophylaxie de l'infection palustre maternelle et d'éventuelles issues indésirables de la grossesse et de l'accouchement. La fréquence des marqueurs moléculaires de la résistance à la S-P et leur impact clinique éventuel sur la grossesse ont également été évalués.

6.3. Méthodes

Conception de l'étude, site et population

Cette étude transversale a été réalisée à l'Hôpital Général de Référence (HGR) de Kingasani situé à Kinshasa, la capitale de la RDC. De septembre 2019 à janvier 2020, des parturientes ont été successivement recrutées à leur arrivée à la maternité et leurs nouveau-nés respectifs examinés immédiatement après l'accouchement. A la base, toutes les femmes en travail qui avaient accepté de participer à l'étude étaient éligibles. Cependant, les femmes présentant des comorbidités ou des conditions susceptibles d'influencer l'issue de la grossesse avaient été exclues (par exemple, les femmes souffrant de maladies chroniques telles que le diabète sucré ou le VIH/SIDA et les femmes ayant une grossesse gémellaire). En RDC, le succès prophylactique de la S-P par rapport aux issues indésirables de la grossesse (notamment le FPN) avait été antérieurement estimé à 93% lors de la prise de ≥ 2 doses et à 89% lors de la prise ou non d'une dose [254]. Par conséquent, en considérant une différence de moins de 5% de succès prophylactique comme étant

cliniquement insignifiante, une taille d'échantillon minimale de 88 femmes sous ≤ 1 dose de S-P et 352 sous ≥ 2 doses (taille totale=440, $r=4$) a été jugé suffisante pour atteindre une puissance statistique de 80% en utilisant un effet de taille d'un test unilatéral de 5%.

Collecte de données et paramètres d'étude

Les informations sociodémographiques et les données sur l'itinéraire médical au cours de la grossesse ont été collectées par le biais d'entrevues à l'aide d'un questionnaire standard (Accessible au <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>). Les données cliniques relatives à l'accouchement et à la naissance ont été obtenues à partir des dossiers médicaux. Le calendrier de prise des doses du TPIg-SP a été reconstitué à partir des informations contenues dans le livret des CPN de chaque femme. Les données biologiques ont été obtenues après des analyses de laboratoire. Toutes les données ainsi collectées ont été compilées par saisie en double aveugle par deux opérateurs indépendants à partir d'une base de données Excel.

Définition des termes

Compte tenu des défis pour le diagnostic du paludisme qui sont spécifiques ou non à l'état gravidique [255, 256], l'infection palustre chez les parturientes a été définie par un indicateur composite généré en incluant les infections détectées soit par un test de diagnostic rapide (TDR) ciblant l'antigène HRP2 (« histidine-rich protein 2 ») de *P. falciparum* ou soit par examen microscopique d'une goutte épaisse de sang. L'anémie maternelle a été définie par un taux d'hémoglobine (Hb) <11 mg/dL obtenu chez les parturientes avant l'accouchement. Le terme de faible poids de naissance (FPN) faisait référence à un poids absolu inférieur à 2500 g quel que soit l'âge gestationnel des femmes. L'accouchement prématuré (APT) était évoqué lorsque l'accouchement d'un enfant vivant survenait avant l'âge gestationnel de 37 semaines d'aménorrhée. Le terme « gestation raccourcie » a été utilisé pour

désigner à la fois la mort fœtale et l'APT. Le niveau de la résistance à la S-P a été stratifié en faible, modéré et élevé en utilisant les seuils de prévalence suivants des mutations particulières des parasites du paludisme : *Pf*DHPS A437G < 90 % ou *Pf*DHPS K540E < 30 % ; *Pf*DHPS A437G ≥ 90 % ou *Pf*DHPS K540E ≥ 30% et < 90 % ; et *Pf*DHPS K540E ≥ 90 % respectivement [234].

Prélèvements biologiques et analyses de laboratoire

Mesure du taux d'Hb et détection de l'infection palustre

Du sang veineux a été prélevé au bras gauche de chaque parturiente avant l'accouchement. Ce sang a été utilisé pour les analyses hématologiques et le diagnostic rapide du paludisme au laboratoire clinique de l'hôpital de Kingasani (RDC). Un frottis épais a été réalisé pour la détection qualitative des parasites de *Plasmodium* par examen microscopique au Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa (RDC). Le taux d'Hb a été mesuré à l'aide de l'analyseur HemoCue© (Quest Diagnostics, Ängelholm, Suède) tandis que le TDR du paludisme a été réalisé avec le test SD Bioline Malaria Ag *Pf* (Standard Diagnostics, ville de Suwon, République de Corée). Toutes ces analyses ont été effectuées en suivant les instructions du fabricant correspondant. L'examen microscopique a été réalisé par deux microscopistes et confirmé à l'aveugle par un tiers indépendant en cas de résultats discordants.

Analyses moléculaires

Des gouttes de sang séché (« dried blood spots », DBS) ont été également collectées sur chaque femme avec TDR positif en utilisant du papier filtre Whatmann 3 MM (GE Healthcare, Royaume-Uni) comme décrit précédemment [257]. Ces DBS ont été utilisées pour la détection des espèces *P. falciparum* et des MMR à la S-P respectivement au Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Kinshasa (RDC) et au Laboratoire de Microbiologie Clinique de l'Université de Liège (Belgique). Tout d'abord, l'ADN a été extrait en utilisant le kit

QIAamp DNA Mini Blood (Qiagen, Allemagne) et en suivant les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été stocké à -20°C dans des tubes étiquetés de manière appropriée. L'espèce *P. falciparum* a été détectée dans des échantillons positifs au TDR en utilisant une amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel suivant un protocole décrit précédemment [258]. Pour l'analyse des MMR, des fragments de gènes de la *PfDHFR* (incluant les codons 51, 59 et 108) et de la *PfDHPS* (incluant les codons 437 et 540) de *P. falciparum* ont été amplifiés à l'aide des PCR nichées dont les protocoles avaient été développés précédemment (**Tableau S6.1**) [259]. Les amplicons de la PCR ont ensuite été criblés pour la présence de mutations ciblées en utilisant la technique de RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism ») comme décrit antérieurement [259]. Des amplicons des PCR sur les clones 3D7, Pérou et Dd2 ont été utilisés comme contrôles internes positifs [260]. Les PCR ont été effectuées dans un thermocycleur conventionnel de type Verity™ (Bio-Rad Laboratories, CA, États-Unis) et un thermocycleur en temps réel ABI 7500 Fast™ (Applied Biosystems, États-Unis). Les échantillons ne contenant aucun produit de PCR détectable ont été réexaminés deux fois avant d'être déclarés négatifs.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été menées à l'aide du logiciel R version 3.5.3 (The R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche). Les fréquences relatives et absolues ont été utilisées pour résumer les variables qualitatives. Des modèles de régression logistique à une ou plusieurs variables ont été ajustés pour évaluer l'association entre divers facteurs et l'infection palustre ainsi que l'effet de différentes doses de S-P sur les issues indésirables de la grossesse. Lorsqu'un modèle à variables multiples a été considéré, le modèle final a été sélectionné sur la base des valeurs du critère d'information d'Akaike (AIC) calculées pour différents modèles potentiels en utilisant à la fois une approche « forward » et « backward ». Pour tous les tests

statistiques appliqués, la valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme le seuil de signification statistique.

Considérations éthiques

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique de l'École de santé publique de l'Université de Kinshasa (numéro d'enregistrement : ESP/CE/235/2019).

6.4. Résultats

Caractéristiques de base des parturientes et des nouveau-nés inclus dans cette étude

Un total de 844 parturientes et leurs nouveau-nés respectifs ont été recrutés et inclus dans cette étude (**Tableau 6.1** ; **Tableau 6.2**). La plupart des femmes étaient âgées de 18 à 35 ans (80,4%), mariées (82,3%) et avaient un niveau d'études secondaire (83,1%). Des accouchements prématurés ont été notés chez 29,3% des femmes. Environ une parturiente sur trois était primigeste (32,9%). La grande majorité des femmes avait été en visite aux services de CPN (98,7%), avait pris au moins une dose de S-P (95,7%) et disposait d'une MIILDA à utiliser pendant la grossesse (97,2%). Cependant, seuls 47,5% d'entre elles avaient atteint les trois doses recommandées de S-P et seuls 48,4% ont admis avoir dormi sous une MIILDA la nuit précédant l'entrevue. Environ 40% des parturientes avaient signalé au moins un épisode de fièvre survenu pendant la grossesse et 58,1% avaient même pris un traitement antipaludique curatif. À l'admission à la maternité, 14,9% de ces femmes avaient une anémie (c'est-à-dire un taux d'Hb < 11 mg/dL). Un accouchement dystocique était signalé chez 25,4% des femmes. Les issues indésirables à la naissance comprenaient une gestation raccourcie, un faible poids de naissance et la mort fœtale observés respectivement chez 28,3, 6,0 et 0,3% des nouveau-nés.

Tableau 6.1. Caractéristiques sociodémographiques et obstétricales des parturientes

Caractéristiques	n	%
État matrimonial (n=838)		
Marié	690	82.3
Divorcé	13	1.6
Seul	135	16,1
Tranche d'âge (années)		
<18	24	2.9
[18-35]	673	80.4
]35-40]	103	12.3
>40	37	4.4
Niveau d'éducation		
Aucun	6	0.7
Primaire	30	3.6
Secondaire	701	83.1
Supérieur ou université	107	12.7
Gravidité		
Primigravidae	193	22.9
Multigravidae	651	77.1
Visite aux CPN la grossesse		
Non	11	1.3
Oui	833	98.7
Prise de la S-P pendant la grossesse		
Pas de prise de la S-P	37	4.3
1 ou 2 doses de S-P	407	48.2
Au moins 3 doses de S-P	401	47.5
Antécédents d'au moins un épisode de fièvre pendant la grossesse		
Non	506	60
Oui	338	40
Possession d'une MIILDA pendant la grossesse		
Non	24	2.8
Oui	820	97.2
Sommeil sous une MIILDA la nuit précédant l'entrevue (n=820)		
Non	397	48.4
Oui	423	51.6
Histoire d'un traitement antipaludique curatif pendant la grossesse		
Non	354	41.9
Oui	490	58.1
Anémie maternelle (Hb<11 g/dL)		
Non	718	85.1
Oui	126	14.9
Accouchement dystocique		
Oui	214	25.4
Non	630	74.6

(*) CPN : Consultations prénatales ; Hb : hémoglobine ; MIILDA : moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action ; S-P : Sulfadoxine-Pyriméthamine

Tableau 6.2. Caractéristiques cliniques des nouveau-nés

Caractéristiques	n	%
Mort fœtale		
Non	841	99.7
Oui	3	0.3
Gestation raccourcie (mort fœtale, APT)		
Oui	239	28.3
Non	605	71.7
Catégorie de poids à la naissance		
FPN	51	6.0
PNN	793	94.0

(*) APT : Accouchement prématuré ; FPN : Faible poids à la naissance ; PNN : Poids de naissance normal.

Paludisme et variable associée chez les parturientes

La prévalence globale du paludisme détectée par TDR ou par examen de la goutte épaisse de sang chez les parturientes était de 10,8% avec une concordance faible entre les deux approches diagnostique ($\kappa=0,35$; $p<0,001$). Les femmes ayant des antécédents de fièvre pendant la grossesse avaient environ 3 fois plus une infection palustre à l'accouchement ($OR=2,9$ [1,5 ; 6,3] ; $p=0,004$) que celles sans antécédents de fièvre. De même, une anémie à l'arrivée à la maternité étaient environ 4 fois plus associées à l'infection palustre ($OR=3,9$ [2,4 ; 6,3] ; $p<0,001$) qu'un taux d'Hb normal (**Tableau 6.3**).

Effet de la prise de la S-P sur différentes issues de la grossesse et de l'accouchement

En référence à l'absence de prise de la S-P, la prise du médicament à une, deux ou ≥ 3 doses pendant la grossesse n'était pas significativement associée à la survenue de paludisme maternel, d'épisodes de fièvre durant la grossesse, de mort fœtale et de dystocie ($p>0,05$). De même, la prise d'une seule dose de S-P (par rapport à la non-prise de la S-P) n'a eu aucun effet significatif sur les issues cliniques indésirables de la grossesse. En revanche, la prise de deux doses de S-P a été associée à une réduction du FPN de 80% ($OR=0,2$ [0,1 ; 0,7] ; $p=0,004$). De plus, la prise d'au moins trois doses de S-P (en référence à la non-prise de la S-P) a été

associée à des résultats cliniques indésirables réduits de 60% en termes d'anémie maternelle (OR=0,4 [0,2 ; 0,9] ; p=0,024) et de gestation raccourcie (OR=0,4 [0,2 ; 0,8] ; p=0,009), et une réduction de 80% en termes de FPN (OR=0,2 [0,1 ; 0,5] ; p<0,001) (**Tableau 6.4**).

Tableau 6.3. Modèle final de régression logistique identifiant les variables associées au paludisme maternel à l'accouchement*

Caractéristiques	Paludisme à l'accouchement		Modèle multi-variable final	
	Positif	Négatif	OR [IC95%]	p-value
(...)				
Antécédents d'au moins un épisode de fièvre pendant la grossesse				
Non	42	464	Réf.	0.004
Oui	49	289	2.9 [1.5; 6.3]	
Possession d'une MIILDA à utiliser pendant la grossesse				
Oui	86	734	Réf.	0.089
Non	5	19	2.5 [0.8; 6.7]	
Anémie maternelle				
Non	59	659	Réf.	<0.001
Oui	32	94	3.9 [2.4; 6.3]	
Histoire d'un traitement antipaludique curatif pendant la grossesse				
Oui	56	434	Réf.	0.085
Non	35	319	1.9 [0.9; 4.2]	

(*) MIILDA : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action

Tableau complet accessible sur <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>

Fréquence de la résistance du *P. falciparum* à la S-P chez les parturientes

Les génotypes de la *PfDHPS* et la *PfDHFR* ont été déterminés avec succès auprès de 43 des 91 parturientes positives au paludisme. Ces génotypes sont marqués par le portage, chez 95,3% des parasités analysés, d'une ou plusieurs mutations codant pour la résistance à la S-P (**Tableau 6.5**). Les mutations les plus fréquentes étaient *PfDHFR* N51I et S108N (88,4%), suivies des *PfDHPS* A437G et *PfDHFR* C59R (79,1%). La mutation la moins fréquemment détectée était *PfDHPS* K540E (32,6%). Les allèles *PfDHFR-PfDHPS* les plus fréquents étaient faits de trois mutations de la *PfDHFR* (N51I, C59R et S108N) avec la mutation *PfDHPS* A437G (IRN-GK ; 44,2%) ainsi qu'avec une mutation *PfDHPS* K540E supplémentaire

(IRN-GE ; 20,9%). Outre les mutants IRN-GK, quelques rares quadruples mutants détectés portaient les mutations *Pf*DHFR N51I et S108N avec *Pf*DHPS A437G et K540E (ICN-GE ; 2,3%) ou les mutations *Pf*DHFR N51I, C59R et S108N avec la *Pf*DHPS K540E (IRN-AE ; 2,3%). Aucune relation statistique n'a pu être observée entre le portage de parasites codant pour ces mutations de résistance S-P chez les parturientes et les issues défavorables de la grossesse (Données accessibles sur <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>).

Tableau 6.4. Modèle de régression logistique uni-variable évaluant l'effet de la prise de doses croissantes de S-P sur différentes issues cliniques indésirables chez les parturientes et leurs nouveau-nés

Résultats cliniques et différentes doses de S-P*	Résultat clinique défavorable		OR [95% CI]	p-value
	Présent	Absent		
Paludisme maternel				
Pas de prise de S-P	7	30	Réf.	
Une dose de S-P	13	128	0.4 [0.2; 1.2]	0.103
Deux doses de S-P	31	235	0.6 [0.2; 1.5]	0.216
Au moins trois doses de S-P	40	360	0.5 [0.2; 1.2]	0.100
Anémie maternelle				
Pas de prise de S-P	9	28	Réf.	
Une dose de S-P	26	115	0.7 [0.3; 1.7]	0.424
Deux doses de S-P	46	220	0.7 [0.3; 1.5]	0.301
Au moins trois doses de S-P	45	355	0.4 [0.2; 0.9]	0.024
Gestation raccourcie (mort fœtale, APT)				
Pas de prise de S-P	28	9	Réf.	
Une dose de S-P	98	43	0.7 [0.3; 1.6]	0.464
Deux doses de S-P	157	109	0.5 [0.2; 0.9]	0.056
Au moins trois doses de S-P	211	189	0.4 [0.2; 0.8]	0.009
Antécédents de fièvre pendant la grossesse				
Pas de prise de S-P	15	22	Réf.	
Une dose de S-P	69	72	1.4 [0.7; 2.9]	0.363
Deux doses de S-P	108	158	1.0 [0.5; 2.1]	0.994
Au moins trois doses de S-P	146	254	0.8 [0.4; 1.7]	0.626
(...)				
FPN				
Pas de prise de S-P	7	30	Réf.	
Une dose de S-P	15	126	0.5 [0.2; 1.4]	0.179
Deux doses de S-P	14	252	0.2 [0.1; 0.7]	0.004
Au moins trois doses de S-P	16	384	0.2 [0.1; 0.5]	<0.001

(*) APT : Accouchement prématuré ; S-P : sulfadoxine-pyriméthamine ; FPN : Faible poids de naissance.

Tableau complet accessible sur <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>

Tableau 6.5. Fréquence des génotypes de la *Pf*DHFR et la *Pf*DHPS des isolats de *P. falciparum* retrouvés chez les parturientes (n=43)

Génotype	n	%
Mutations <i>Pf</i>DHFR		
N51I	38	88.4
C59R	34	79.1
S108N	38	88.4
Mutations <i>Pf</i>DHPS		
A437G	34	79.1
K540E	14	32.6
Allèles <i>Pf</i>DHFR-<i>Pf</i>DHPS (avec les acides aminés mutants soulignés)		
NCS-AK (type sauvage)	2	4.7
NCS- <u>GE</u> (<i>Pf</i> DHPS A437G et K540E)	3	7.0
<u>ICN</u> -AK (<i>Pf</i> DHFR N51I et S108N)	1	2.3
<u>ICN</u> -GK (<i>Pf</i> DHFR N51I et S108N ; et <i>Pf</i> DHPS A437G)	2	4.7
<u>ICN</u> - <u>GE</u> (<i>Pf</i> DHFR N51I et S108N ; et <i>Pf</i> DHPS A437G et K540E)	1	2.3
<u>IRN</u> -AK (<i>Pf</i> DHFR N51I, C59R et S108N)	5	11.6
<u>IRN</u> - <u>AE</u> (<i>Pf</i> DHFR N51I, C59R et S108N ; et <i>Pf</i> DHPS K540E)	1	2.3
<u>IRN</u> -GK (<i>Pf</i> DHFR N51I, C59R et S108N ; et <i>Pf</i> DHPS A437G)	19	44.2
<u>IRN</u> - <u>GE</u> (<i>Pf</i> DHFR N51I, C59R et S108N ; et <i>Pf</i> DHPS A437G et K540E)	9	20.9

6.5. Discussion

Cette étude indique que dans l'ensemble, une parturiente sur dix était infectée par le paludisme à son arrivée à la maternité de Kingasani. D'où la nécessité d'une prise en charge rigoureuse et d'une prévention efficace du paludisme maternel de la zone d'étude. Les efforts de mise à échelle du TPIg-SP pourraient donc être considérés comme étant bénéfiques et nécessaires pour atténuer l'impact du paludisme sur la grossesse dans la population étudiée. Cependant, étant donné la propagation nationale du paludisme résistant à la S-P, des inquiétudes ont été soulevées et persistent encore quant à l'utilité clinique de la S-P pour la prévention du paludisme pendant la grossesse [254, 261]. Pour y répondre tant soit peu, cette étude a évalué les effets prophylactiques de l'association médicamenteuse. Les paramètres mesurés à cette fin comprenaient le paludisme maternel à l'accouchement et diverses issues cliniques indésirables de la grossesse et de l'accouchement. Les résultats montrent que la prise de la S-P pendant la grossesse n'a pas eu d'effet

significatif sur le paludisme maternel à l'accouchement ainsi que sur la survenue d'épisodes de fièvre et les décès fœtaux pendant la grossesse. Une explication plausible de ces résultats peut être un manque de puissance statistique suffisante pour détecter des différences statistiques, en particulier en ce qui concerne les décès fœtaux survenus dans seulement un petit nombre de cas ($n=3$). Une autre explication serait une perte de l'efficacité prophylactique du médicament en raison du développement des parasites résistants à la S-P [234].

Cependant, une éventuelle relation entre les effets prophylactiques du médicament et les parasites résistants à la S-P n'a pas pu être évaluée de manière fiable dans cette étude, en raison du petit nombre de parasites dont le génotype avait été déterminé qui ne permettait pas d'atteindre la puissance statistique voulue. En outre, traduire une telle association en un lien de causalité confirmé nécessiterait une analyse complète prenant en compte plusieurs autres facteurs pouvant contribuer à la réduction de la clairance parasitaire après prise du TPIg-SP, tels que la dynamique de transmission du paludisme dans la région, les effets de la grossesse sur la pharmacocinétique des doses de S-P, le calendrier d'administration des doses de S-P par rapport au moment de survenue des infections durant la grossesse, le statut de l'immunité acquise pendant la grossesse et la susceptibilité au paludisme liée à l'état gravidique [222, 234, 262, 263]. Quelle que soit sa cause possible, le paludisme persistant pendant la grossesse potentialise la prolifération placentaire de parasites qui peuvent avoir un impact direct sur la morbidité et la mortalité néonatales, ainsi qu'un effet indirect sur l'épidémiologie du paludisme en servant de réservoir pour la transmission des parasites dans la communauté, y compris ceux résistants aux médicaments antipaludiques [224, 251]. Contrairement aux effets antipaludiques attendus, un effet prophylactique significatif de la prise de la S-P a été noté vis-à-vis des issues indésirables de la grossesse et de l'accouchement, à savoir l'anémie maternelle à l'accouchement, la gestation raccourcie et le FPN, en particulier lorsque des doses accrues du médicament étaient utilisées. Une méta-analyse globale récemment publiée indique une résistance

croissante du paludisme à la S-P, une perte généralisée de l'effet antipaludique du TPIg-SP mais une conservation des effets bénéfiques de ce médicament par rapport aux issues de la grossesse et de l'accouchement [63, 234, 238, 264]. Il est probable que la S-P confère des effets supplémentaires qui sont indépendants de ses propriétés antipaludiques et qui comprendraient des effets antibactériens à large spectre et ceux immunomodulateurs similaires à ceux décrits pour le cotrimoxazole (triméthoprine-sulfaméthoxazole), une autre association d'antifolates [238-242]. Grâce à ces effets additionnels, malgré des niveaux préoccupants de résistance parasitaire, le TPIg-SP pourrait continuer à prévenir les causes non-paludéennes d'issues défavorables de la grossesse, telles que les infections sexuellement transmissibles curables et les infections de l'appareil reproducteur [239]. Par conséquent, combiner la S-P pour ses effets non paludiques avec des molécules partenaires capables d'apporter des effets antipaludiques comme la DHA serait une stratégie plus attrayante que l'utilisation isolée de la S-P pour le TPIg et devrait être considéré dans les études futures [242].

La résistance à la S-P résulte d'une accumulation progressive de mutations dans les gènes de la *PfDHFR* et de la *PfDHPS* du *Plasmodium*. Dans cette étude, presque tous les isolats analysés portaient au moins un MMR à la S-P (95,3%). La prévalence des mutations *PfDHFR* N51I et S108N notée ici (88,3% des isolats) est cohérente avec les observations précédemment faites en RDC [217, 223, 252]. La substitution *PfDHPS* K540E était la mutation la moins détectée (32,5%). Cette mutation est considérée comme étant un marqueur épidémiologique pour les parasites porteurs de la quintuple mutation (portage simultané de N51I, C59R et S108N sur *PfDHFR* avec A437G et K540E sur *PfDHPS*) en Afrique, qui est un indicateur du niveau de perte d'efficacité clinique au TPIg-SP [265]. Sur cette base, les régions sont classées en niveau de résistance à la S-P élevé, modéré et faible lorsque la fréquence de la mutation *PfDHFR* K540E est <30%, varie de ≥30% à <90% et est ≥90%, respectivement [234]. Cependant, des preuves ont montré que le TPIg-SP reste protecteur contre les issues indésirables de la grossesse dans un

large éventail de niveaux de résistance à la S-P, y compris en cas de forte prévalence de parasites porteurs de la quintuple mutation [234, 265]. Par conséquent, l'OMS recommande que le TPIg-SP reste indiqué même dans les zones à forte prévalence de la mutation *PfDHFR* K540E [234, 247]. Ainsi donc, la poursuite de l'utilisation continue de la S-P pour le TPIg dans la population étudiée peut être considérée comme étant nécessaire. Toutefois, de façon remarquable, la mutation *PfDHPS* K540E s'est produite à des taux presque deux fois supérieurs à ceux rapportés chez les parasites collectés dans la population générale de la région d'étude [237]. Il est possible que la région d'étude soit passé d'un niveau de résistance à la S-P « faible » vers un niveau « modéré » selon les critères établis par van Eijk AM et al. [234]. Il est aussi possible que le recours fréquent des femmes enceintes au TPIg-SP ait pu sélectionner des parasites plus résistants (y compris ceux porteurs de *PfDHPS* K540E) par rapport aux parasites circulant dans la population générale. Des efforts accrus ciblant les femmes enceintes sont donc nécessaires pour contenir toute évolution vers une situation avec un niveau de résistance plus élevé à la S-P dans la région. Dans l'ensemble, les allèles *PfDHFR*-*PfDHPS* accumulés par les parasites ont généré huit haplotypes différents parmi les parasites mutants ayant été identifiés dans cette étude. Parmi ces haplotypes, les quadruples mutants étaient les plus fréquents (48,7%), comprenant principalement IRN-GK (fait des mutations *PfDHFR* N51I, C59R et S108N avec *PfDHPS* A437G) mais aussi IRN-AE (*PfDHFR* N51I, C59R et S108N avec *PfDHPS* K540E) et ICN-GE (*PfDHFR* N51I et S108N avec *PfDHPS* A437G). Ce profil est cohérent avec plusieurs rapports faits auprès des femmes enceintes des pays africains, y compris la RDC, où les parasites avec un haplotype IRN-GK peuvent dépasser 50% [61, 223]. De plus, un parasite sur cinq dans la population étudiée (20,9%) s'est avéré être un quintuple mutant IRN-GE porteur des mutations N51I, C59R et S108N sur la *PfDHFR* en plus de A437G et K540E sur la *PfDHPS*. Ces quadruples et quintuples mutants devraient attirer au maximum l'attention des décideurs sanitaires du pays. Premièrement, ils sont connus pour réduire l'efficacité de la S-P

comme TPIg ou comme TPIe, en diminuant la clairance parasitaire et en raccourcissant la période prophylactique post-traitement [63, 223, 250, 252, 266-268]. Par ailleurs, ces mutants peuvent constituer un fond génétique pour l'émergence de parasites porteurs de mutations quintuples spécifiques (par exemple, ICN-GEG émergeant des mutants avec *PfDHFR* N51I, C59R, S108N et *PfDHPS* A437G, K540E) et de mutations sextuples (par exemple, IRN-GEG émergeant de mutants porteurs de *PfDHFR* N51I, C59R et S108N ainsi que *PfDHPS* A437G et K540E) en générant une mutation *PfDHPS* A581G supplémentaire, laquelle est impliquée dans la transition vers une résistance de haut niveau à la S-P avec une perte de la capacité du TPIg-SP à prévenir des issues indésirables à la naissance telles que le FPN [234-236]. Récemment, des données alarmantes ont été rapportées par Mandoko et al. qui ont détecté l'émergence de cette mutation A581G sur des mutants septuples (par exemple, IRNL-GEG composé de *PfDHFR* N51I, C59R, S108N et I164L avec *PfDHPS* A437G, K540E et A581G) et même sur des mutants octuples (par exemple, IRNI-VAKGGS portant *PfDHFR* N51I, C59R et S108N, ainsi que *PfDHPS* I431V, S436A, A437G, A581G et A613S) dans la région d'étude [237]. En conséquence, il est probable que la population étudiée connaisse une situation transitoire vers une perte plus importante des effets prophylactiques du TPIg-SP ; une situation devant être gérée de manière proactive.

La présente étude a comporté plusieurs limites. Premièrement, l'enquête menée peut être sujette à des erreurs dans la détection du paludisme et des MMR à la S-P. En milieu endémique, le paludisme de la femme enceinte peut être sous-estimé compte tenu de la présence d'érythrocytes infectés séquestrés dans le placenta, et qui nécessitent idéalement des examens histopathologiques pour le diagnostic [222, 245]. La technique de RFLP permet la détection d'un nombre très limité de mutations (dans ce cas, uniquement *PfDHFR* N51I, C59R et S108N ; et *PfDHPS* A437G et K540E). Il serait donc spéculatif d'imaginer la présence ou l'absence d'autres mutations importantes qui n'ont pas été analysées (par exemple, *PfDHPS*

I431V et A581G). Cependant, même si la prévalence de *PfDHPS* A581G devrait être plus faible à Kinshasa qu'en Afrique de l'Est, nous reconnaissons que cette mutation spécifique mérite d'être étudiée à l'avenir étant donné sa pertinence clinique pour les échecs TPIg-SP et l'inquiétude croissante suscitée par son émergence dans d'autres régions d'Afrique. Deuxièmement, l'enquête n'a probablement pas pu éviter tous les potentiels biais d'information et de mémoire inhérents à toute entrevue, même si l'utilisation de dossiers médicaux et de livrets de soins prénatals aurait pu réduire ces biais. Troisièmement, une relation possible entre les différents allèles *PfDHFR-PfDHPS* des parasites *P. falciparum* et les issues indésirables de la grossesse n'a pas pu être évaluée de manière fiable dans cette étude. Cela était probablement dû à la petite taille de l'échantillon de parasites dont le génotype avait pu être déterminé (43 parasites dont seulement deux de type sauvage) et qui n'a pas permis d'atteindre une puissance statistique suffisante pour détecter des différences dans les résultats cliniques. Des études futures qui pourraient déterminer le génotype d'un plus grand nombre de parasites pourront venir remédier à cette insuffisance. De plus, cette étude qui a porté sur un seul hôpital dans un site ne peut être représentative de l'ensemble de la population étudiée. Des études similaires sur d'autres sites sont nécessaires pour étendre les observations faites ici. Enfin, la conception transversale de cette étude n'a peut-être pas permis de capturer certaines informations bien qu'elle peut être considérée comme une conception éthiquement acceptable compte tenu des défis liés à la conduite d'essais cliniques chez les femmes enceintes [269].

6.6. Conclusion

En dépit de ces limites, cette étude fournit des informations intéressantes pour la population étudiée. Premièrement, les résultats indiquent que le paludisme reste un problème de santé grave et fréquent, associé à la fièvre et à l'anémie pendant la grossesse. Deuxièmement, les parasites du *P. falciparum* résistants à la S-P

semblent plus fréquents chez les femmes enceintes que dans la population générale. Cependant, le profil moléculaire reste compatible avec la poursuite de l'utilisation de la S-P pour le TPIg. Bien que ces parasites résistants puissent jouer un rôle possible dans la diminution observée de l'effet prophylactique du TPIg-SP, une telle association ne peut être confirmée qu'avec une analyse complète incluant d'autres facteurs tels que la pharmacocinétique de l'hôte et le moment des prises du TPIg-SP par rapport à la survenue des infections palustres. Enfin, malgré les inquiétudes suscitées par la clairance parasitaire réduite à l'accouchement après prise du TPIg-SP, un effet protecteur de la S-P sur les issues indésirables de la grossesse et de l'accouchement (par exemple, l'anémie maternelle, la gestation raccourcie et le FPN) était préservé. Cela suggère que le médicament exerce probablement des effets bénéfiques indépendants de ses propriétés antipaludiques. Compte tenu de tous ces résultats, des efforts accrus sont nécessaires de toute urgence pour contrôler plus efficacement le paludisme et la résistance aux antipaludiques pendant la grossesse. Bien que l'administration du TPIg-SP reste utile, ses effets antipaludiques nécessitent d'être renforcés par des stratégies alternatives telles qu'une combinaison avec des médicaments partenaires. Au reste, une surveillance des parasites résistants à la S-P chez les femmes enceintes doit être poursuivie dans la région d'étude et étendue ailleurs dans le pays, en vue d'orienter en permanence les décisions stratégiques contre le paludisme.

Contributeurs

NS, MPH, PDM, GLM, DMM, ARA, BD, DMY et NKK ont conçu l'étude. NKK a écrit le protocole. NKK et DYM ont mené l'enquête sur le terrain et collecté les données. DYM et VRTK ont effectué les analyses au laboratoire. NKK a effectué les analyses de données et rédigé la première ébauche du manuscrit. DYM, VRTK, DMM, PZK, BD, EM, PDM, M-PH, GLM, ARA, PLD et NS ont révisé la première version du manuscrit. Tous les auteurs ont fourni une contribution conceptuelle avant de réviser et approuver la version finale du manuscrit.

Déclaration d'intérêts

Nous ne déclarons aucun intérêt concurrent.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Anna Rosanas du Laboratoire de Paludologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMT) qui nous a généreusement fourni les échantillons d'ADN des souches de référence de *P. falciparum*.

Sources de financement

Ce travail a été soutenu financièrement par la Coopération Belge à travers l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES).

Accessibilité des données

Des données supplémentaires à cet article peuvent être trouvées en ligne à l'adresse <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>.

CHAPITRE 7. COMPORTEMENTS DE RECHERCHE DE SOINS ET POIDS SOCIO-ECONOMIQUE ASSOCIES AU PALUDISME NON COMPLIQUE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

Auteurs : Nadine Kayiba Kalenda, Doudou Malekita Yobi, Brecht Devleesschauwer, Dieudonné Makaba Mvumbi, Pius Zakayi Kabututu, Joris Losimba Likwela, Lydie Azama Kalindula, Patrick DeMol, Marie-Pierre Hayette, Georges Lelo Mvumbi, Paul Dikassa Lusamba, Philippe Beutels, Angel Rosas-Aguirre, Niko Speybroeck.

Article: Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2021 Jun 9;20(1):260.

Lien : <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>.

7.1. Résumé

Contexte : Cette étude visait à estimer le poids socio-économique du paludisme non compliqué et à explorer les comportements adoptés par les patients lors du recours aux soins et qui sont susceptibles d'influencer ce poids socio-économique en République Démocratique du Congo (RDC), un pays classé au deuxième rang mondial des pays les plus touchés par le paludisme.

Méthodes : En 2017, une enquête transversale a inclus des patients atteints de paludisme non compliqué dans 64 établissements de santé situés sur 10 sites sentinelles du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en RDC. Un questionnaire standard a été utilisé pour évaluer les comportements de quête de soins par les patients. La qualité de vie liée à l'état de santé (HRQL) et les poids de désutilité (DW) liée à la maladie ont été évalués en utilisant le système descriptif du groupe EuroQol (EQ-5D-3L) et son échelle visuelle analogique (EQ VAS). Les coûts du paludisme ont été estimés selon la perspective du patient. Les analyses de

sensibilité probabilistes (PSA) ont aidé à évaluer l'incertitude entourant les estimations des coûts. Des modèles de régression linéaire généralisée ont été ajustés pour évaluer l'effet des facteurs prédictifs potentiels sur le temps perdu et le DW pendant la maladie.

Résultats : Au total, 1080 patients (âge : $13,1 \pm 14$ ans ; ratio H/F : 1,1) ont été inclus. Les coûts totaux moyens des soins s'élevaient à 36,3 USD [IC95 % : 35,5-37,2] par épisode de paludisme, dont 16,7 USD [IC95 % : 16,3-17,1] comme coûts directs et 19,6 USD [IC95 % : 18,9 à 20,3] de coûts indirects. Lors de la quête de soins, les patients économiquement actifs et leurs proches ont perdu respectivement $3,3 \pm 1,8$ et $3,4 \pm 2,1$ jours ouvrables. Cette perte de temps s'est produite principalement au stade pré-hospitalier et était le paramètre le plus associé à l'incertitude entourant les estimations des coûts du paludisme. Les patients se sont auto-évalués à une moyenne de $0,36 \pm 0,2$ de DW et une moyenne de $0,62 \pm 0,3$ d'indice EQ-5D par épisode. Un manque de couverture d'assurance maladie (896 sur 1080 ; 82,9%) a été lié à des coûts considérablement plus élevés, à une qualité de vie inférieure et à un DW plus lourd tout en entraînant une perte de temps plus longue pendant la maladie. Les résidents des zones rurales encouraient un fardeau socio-économique de paludisme non compliqué disproportionnellement plus élevé avec une perte de temps plus longue en raison de la maladie et un accès limité aux mécanismes d'assurance maladie.

Conclusion : Le paludisme non compliqué est associé à des coûts économiques élevés des soins en RDC. Les efforts de réduction du coût de la maladie doivent cibler le temps perdu au stade pré-hospitalier et les disparités sociales dans la population, tout en renforçant les mesures de lutte contre le paludisme dans le pays.

Mots-clés : Paludisme ; Coût de la maladie ; Qualité de vie liée à la santé ; Programme National de Lutte contre le Paludisme ; République Démocratique du Congo.

7.2. Introduction

La République Démocratique du Congo (RDC) représente un dixième du fardeau du paludisme en Afrique avec plus de 15 millions de cas et 25 mille décès enregistrés chaque année [4, 22, 270, 271]. Outre cette morbidité et sa mortalité élevées, le paludisme détourne probablement d'importantes ressources financières des individus et du pays vers les efforts de prévention et de traitement [2, 3]. En effet, le fardeau du paludisme pèse lourdement sur les ménages, sur le système de santé ainsi que sur la croissance et le développement économiques des pays touchés [3, 271, 272]. Tout en affectant la santé et la richesse de la nation, le paludisme est à la fois une maladie de la pauvreté et une cause de la pauvreté dans les pays endémiques comme la RDC [272].

Pour faire face au paludisme, la RDC a mis en place, à travers son Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), une politique sanitaire qui préconise un accès universel gratuit aux services de prévention, de diagnostic et de traitement du paludisme dans différents établissements de santé [35, 40]. Cependant, les patients atteints de paludisme font toujours face à plusieurs obstacles pour accéder aux services de santé, y compris les coûts économiques élevés des soins [20, 273]. En effet, avec moins de 10% de la population couverts par des polices d'assurance maladie, le système de santé national dépend fortement des contributions directes des ménages, même pour des maladies, comme le paludisme, qui reçoivent une aide multilatérale substantielle [38, 121]. Ces coûts élevés peuvent engendrer un découragement des patients à recourir aux soins de santé antipaludique et un recours accru à des soins parallèles ou des pratiques sanitaires informelles dont l'efficacité thérapeutique est douteuse [38, 274].

Évaluer les coûts des soins du paludisme et identifier leurs déterminants peuvent fournir des informations essentielles pour un plaidoyer plus efficace en faveur d'un financement de la part d'organisations gouvernementales et non gouvernementales afin de réduire les dépenses directes de santé par la population. De plus, les

facteurs clés influençant les coûts des soins de santé sont indispensables pour une prise de décisions factuelles dans l'établissement des priorités de santé et l'allocation des ressources de lutte antipaludique [121, 275]. Le revenu individuel, la situation géographique et les stratégies de soins de santé du pays ont ainsi été largement décrits comme étant des déterminants importants des coûts économiques du paludisme à l'échelle de la population [275]. Les comportements adoptés pour la recherche de soins de santé (par exemple, l'automédication, le recours tardif aux soins) étant en lien avec les croyances personnelles et le niveau de sensibilisation pour la santé sont fréquemment signalés comme influençant aussi le coût de la maladie [276-278]. La forme clinique du paludisme présentée par les franges des populations infectées – c'est-à-dire le paludisme sévère ou non compliqué – peut également affecter considérablement le poids économique de la maladie dans une région. En effet, contrairement à la forme sévère du paludisme qui se limite à des groupes spécifiques à haut risque (par exemple, les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes, les patients immunodéprimés), le paludisme non compliqué présente un excellent pronostic dans les 48 à 72 heures suivant un diagnostic précoce et un début rapide d'un traitement efficace [279, 280]. Toutefois, cette forme clinique de paludisme pourrait représenter le fardeau le plus élevé en raison de sa forte incidence et de la survenue au fil du temps de multiples épisodes intermittents chez les mêmes personnes [280]. Cependant, seules des études limitées ont été menées pour évaluer les coûts du paludisme, en se concentrant principalement sur le paludisme sévère et sur des épisodes de paludisme à petite échelle (par exemple, un seul hôpital ou une seule ville) en RDC [274, 281-283]. La présente étude visait ainsi à estimer le fardeau socio-économique du paludisme non compliqué à travers l'étendue de la RDC tout en explorant les comportements de recherche de soins de santé susceptibles d'influencer le coût de la maladie.

7.3. Méthodes

Cadre d'étude

En RDC, le système de santé est organisé selon une structure pyramidale à trois niveaux: le Ministère National de la Santé publique (c'est-à-dire le niveau central), les inspections provinciales de la santé (c'est-à-dire le niveau intermédiaire) et les zones de santé (c'est-à-dire le niveau périphérique) [38, 121]. Les zones de santé, classées en zones rurales ou urbaines en fonction de leur situation géographique, regorgent des établissements de santé qui sont situés au cœur de la fourniture des soins antipaludiques et sont essentiels au succès de la prise en charge clinique dans le pays [35]. Le PNLP gère les activités de lutte contre le paludisme dans chacune des zones de santé et surveille régulièrement l'efficacité des stratégies de lutte antipaludique à travers un réseau de sites sentinelles installés dans 26 zones de santé sélectionnés [38, 40]. Cette étude a été menée dans dix de ces sites sentinelles du PNLP pour évaluer le coût de la maladie dans des conditions urbaines et rurales pendant le paludisme non compliqué.

Participants à l'étude

Cette étude ciblait des patients atteints de paludisme non compliqué qui avaient eu besoin des soins et recevaient un traitement dans les établissements de santé situés dans l'un des sites sélectionnés. Un cas de paludisme non compliqué était défini comme tout patient symptomatique ayant un diagnostic de paludisme confirmé par microscopie ou test de diagnostic rapide et dont l'état clinique ne nécessitait pas d'hospitalisation. Les patients présentant des comorbidités connues (c'est-à-dire une autre maladie chronique ou aiguë diagnostiquée) ou une grossesse documentée ont été exclues de l'étude pour permettre, dans la mesure du possible, une évaluation spécifique de l'impact du paludisme sur la qualité de vie des patients.

Conception de l'étude et collecte de données

Une enquête transversale a été menée de janvier à décembre 2017 dans 10 des 26 sites sentinelles du PNLP, sélectionnés en fonction de leur accessibilité et de leur fonctionnalité pour les activités de surveillance du paludisme. Trois de ces sites étaient situés dans des zones urbaines (Kinshasa, Lubumbashi et Kisangani) et sept dans des zones rurales (Vanga, Bolenge, Karawa, Kalima, Fungurume, Kamina et Katana) (**Figure 7.1**).

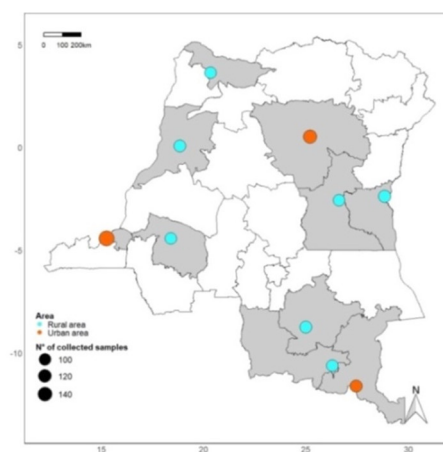


Figure 7.1. Carte géographique des sites d'échantillonnage en RDC.

Les cercles représentent les sites sentinelles du PNLP ayant été ciblés par l'enquête. Les cercles de couleur orange représentent les sites situés dans les zones de santé urbaines et les cercles de couleur aquatique, ceux dans les zones rurales. Les régions ombrées en gris représentent les provinces où se situaient les sites enquêtés. Le diamètre des cercles est proportionnel à la taille de l'échantillon de patients inclus sur chaque site.

Au total, 64 établissements de santé ont participé à la collecte des données. Sur chaque site de collecte, l'équipe de recherche sur le terrain était composée de l'infirmier en chef responsable des activités de lutte contre le paludisme de la zone de santé correspondante, d'un médecin généraliste et/ou d'un infirmier et d'un technicien de laboratoire recrutés dans un établissement de santé local. Toutes les équipes ont été initialement formées pour mener des entrevues à l'aide des questionnaires d'étude (Accessibles sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789->

w). Les données collectées comprenaient les caractéristiques socio-économiques, les connaissances générales sur le paludisme, les attitudes et pratiques liées au paludisme au niveau des ménages, les informations sur les épisodes de paludisme précédents et actuels avec des détails sur la trajectoire suivie pendant la recherche de soins, ainsi que les dépenses encourues et le temps perdu en raison de l'épisode actuel de paludisme. De plus, la qualité de vie liée à l'état de santé (HRQL) a été évaluée pour chaque patient à son arrivée dans l'établissement de santé à l'aide du système descriptif du groupe EuroQol (EQ-5D-3L) et de son échelle visuelle analogique (EQ VAS) [284, 285]. Les données recueillies ont été saisies en double aveugle sur une feuille de calcul Excel, vérifiées par recoupement et corrigées.

Estimation des coûts économiques

Les coûts économiques totaux des épisodes de paludisme non compliqués en RDC ont été estimés pour l'année 2017 en procédant par deux étapes. Premièrement, des paramètres basés sur les cas (c'est-à-dire des paramètres de coût ou des coûts moyens) ont été obtenus grâce à l'enquête sur le terrain suivant une approche ascendante mesurant les coûts de santé sous la perspective du patient. Une approche «ascendante» estime les coûts totaux pour des services de soins de santé spécifiques en s'appuyant sur les entrées de dépenses enregistrées au niveau individuel, plutôt que sur des données agrégées au niveau de la population qui seraient nécessaires pour une méthode «descendante» [286]. Les coûts perçus «sous la perspective du patient» sont définis comme étant des dépenses estimées d'un point de vue des patients, selon leur expérience des services de soins de santé et selon l'impact auto-perçu de l'état de santé sur leur vie, ainsi que de leurs attentes vis-à-vis de la consultation des soignants et leurs priorités concernant les résultats du traitement [287]. Deux catégories d'intrants ont été utilisées pour estimer les coûts moyens totaux, comprenant les coûts directs et indirects des soins pour le paludisme non compliqué [286, 287]. Dans une deuxième étape, les coûts totaux pour le pays ont été estimés en extrapolant les coûts moyens à tous les épisodes de

paludisme enregistrés à travers le pays par le PNLP en 2017. Les coûts unitaires initialement obtenus en Francs congolais (CDF) ont été convertis en dollars américains (USD) en utilisant le taux de change moyen en 2017 (un USD=1648 CDF).

Coûts directs

Les coûts directs ont été définis comme étant les dépenses personnelles de santé payées par un patient et ses proches pour les produits et services médicaux (c'est-à-dire les coûts médicaux directs) utilisés pour détecter et traiter l'épisode de paludisme, ainsi que les coûts des services non médicaux (c'est-à-dire les coûts directs non médicaux) qui résultent de la maladie [286, 287]. Les ressources pour ces dépenses personnelles ont été investiguées à la fois au stade pré-hospitalier (c'est-à-dire en dehors du circuit des établissements de santé formels et avant la consultation médicale) et au stade hospitalier (c'est-à-dire après la consultation médicale). Les frais engagés au stade hospitalier comprenaient les frais de consultation médicale, les analyses de laboratoire (diagnostic par TDR et autres tests biologiques), le traitement (c.-à-d. Les médicaments antipaludiques, les antipyrétiques, les analgésiques, les vitamines et l'administration des soins) et le suivi. Les coûts du suivi médical comprenaient les frais d'une deuxième consultation médicale et d'un examen microscopique programmé trois jours après le début du traitement antipaludique conformément aux directives nationales de traitement du paludisme. Les coûts non médicaux directs étudiés dans cette étude comprenaient les frais de transport pour un patient et ses proches, ainsi que d'autres coûts résultant de la maladie (y compris les appels téléphoniques, la nourriture consommée pendant le processus de recherche de soins).

Coûts indirects

Les coûts indirects du paludisme ont été définis comme les pertes potentielles de productivité ou de revenu du travail que les individus économiquement actifs (EA)

subissaient en raison de la maladie [286]. Ainsi, l'estimation des coûts indirects a été faite en multipliant le temps de travail perdu tel que déclaré en jours (paramètre de coût exprimé en jours-personnes) par le montant d'argent perdu en une journée de travail manqué (coût unitaire par jour-personne). Les coûts unitaires par jour-personne (5,0 USD) pour les patients, les proches et les éventuels suppléants sur le lieu de travail ont été calculés en utilisant le salaire minimum mensuel de 2017 comme référence divisé par le nombre de jours ouvrables par mois (<http://www.fec-rdc.com/index.php/nos-publications/category>; consulté le 15 décembre 2019). Les individus EA ont été définis comme étant ceux qui avaient ≥ 15 ans [288]. Les pertes de temps incluses dans l'estimation des coûts ont été obtenues en interrogeant le temps d'attente lors des soins de santé, les jours d'arrêt des activités quotidiennes (école ou travail) pour cause de maladie (dans le cas du patient) ou en raison de la nécessité de prendre en charge les soins d'un patient (dans le cas des proches du patient).

Coût moyen par épisode et coûts totaux

Les coûts directs et indirects obtenus d'un point de vue du patient ont constitué le coût total moyen par épisode de paludisme. Les coûts de tous les épisodes de paludisme survenant en une année par patient ont été obtenus en multipliant les coûts totaux moyens par le nombre d'épisodes éventuels de paludisme rapportés dans un an. Les coûts totaux pour le pays en 2017 ont été obtenus en multipliant les coûts totaux moyens par le nombre d'épisodes de paludisme enregistrés dans la base de données du Système National d'Information Sanitaire (SNIS) du PNLP pour cette même année.

Évaluation de la qualité de vie et du poids de désutilité au cours des épisodes de paludisme

La qualité de vie liée à l'état de santé (HRQL) pendant le paludisme non compliqué a été évaluée à l'aide de la boîte à outils EQ-5D développée par le groupe EuroQol

[284, 285]. Cette boîte à outils comprend une version à trois niveaux du système EQ-5D (EQ-5D-3L) et une échelle visuelle analogique (EQ VAS) qui permet de mesurer les résultats de santé en fonction du jugement propre du patient [289]. L'EQ-5D-3L est un système descriptif qui classe l'état de santé en trois niveaux (c'est-à-dire, « Aucun problème », « problèmes modérés » et « problèmes extrêmes ») à travers chacune de ses cinq dimensions, à savoir : la mobilité, les soins personnels, les activités habituelles, la douleur ou l'inconfort ainsi que l'anxiété ou la dépression. Les états de santé EQ-5D-3L ont ensuite été convertis en scores d'indice «d'utilité» en utilisant l'algorithme établi sur la base des valeurs de préférence sociétales définies pour la population zimbabwéenne [290]. En effet, au moment de cette étude, cet algorithme était le seul rendu disponible pour convertir le questionnaire EQ-5D-3L en un score d'indice EQ-5D sur une population d'Afrique subsaharienne. La formule $DW=1-(\text{score EQ VAS} / 100)$ a été utilisée pour estimer le poids de la désutilité (DW) sur la base de l'auto-évaluation du patient sur l'échelle visuelle EQ VAS dont les valeurs vont de 100 «meilleur état de santé imaginable» à 0 «pire état de santé imaginable» [291].

L'analyse des données

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel R version 3.5.3 (The R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche, 2019). Les fréquences absolues et relatives ont été utilisées pour résumer les variables qualitatives. Les moyennes avec les écarts-types correspondants (SD) ont été utilisées pour décrire les caractéristiques quantitatives des patients, tandis que les moyennes avec les erreurs-standard (ES) décrivaient l'écart déduit sur la population. Le cas échéant, les variables qualitatives ont été comparées entre groupes à l'aide du test du chi carré ou du test exact de Fisher. En revanche, les variables quantitatives ont été comparées à l'aide de tests paramétriques (par exemple, test ANOVA ou test t) ou non paramétriques (test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis ou test de la somme des rangs de Wilcoxon avec correction de

continuité). Les conditions de normalité et d'homogénéité des variances des distributions ont été vérifiées à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Lévine. De plus, des modèles linéaires généralisés (GLM) à une ou plusieurs variables ont été ajustés pour évaluer l'effet des facteurs prédictifs potentiels sur le temps perdu et le DW durant le paludisme non compliqué. Une distribution gamma et une distribution bêta avec une fonction de liaison logarithmique ont été respectivement utilisés pour modéliser le temps perdu et le DW. Chaque fois qu'un modèle à plusieurs variables était considéré, le modèle final était sélectionné sur la base des valeurs de « Critères d'Information d'Akaike » (AIC) calculées pour les GLM selon un algorithme pas à pas utilisant à la fois les approches « forward » et « backward ». Un niveau de signification de $p < 0,05$ a été considéré pour tous les tests statistiques utilisés.

Une analyse de sensibilité probabiliste (PSA) a été utilisée pour évaluer le niveau de confiance des estimations de coûts moyens par épisode de paludisme non compliqué en RDC (coûts totaux pour le pays en 2017, divisés par le nombre total d'épisodes). Cela a pris en compte l'incertitude entourant les paramètres de base les plus pertinents (c'est-à-dire, les estimations ponctuelles des paramètres de coût et des coûts unitaires obtenus dans l'enquête) en définissant les distributions de probabilité pour ces derniers, comme décrit antérieurement [292]. La distribution bêta a été choisie pour la probabilité d'être EA chez les patients atteints de paludisme ou chez leurs proches ; tandis que la distribution gamma a été utilisée pour les coûts unitaires (par exemple, les coûts unitaires liés au diagnostic et au traitement du paludisme) et le temps perdu au travail en raison d'un épisode de paludisme. Ensuite, 10000 simulations de Monte Carlo ont été menées pour propager l'incertitude en échantillonnant conjointement les valeurs de toutes les distributions de probabilité et en calculant les valeurs correspondantes pour le coût par épisode de paludisme. Enfin, des limites d'incertitude supérieures et inférieures à 95% (2,5 et 97,5%) pour le coût par épisode de paludisme ont été obtenues à partir de ces simulations et présentées à l'aide de diagrammes de tornades.

7.4. Résultats

Caractéristiques socio-économiques des patients atteints de paludisme non compliqué en RDC

Dans l'ensemble, 1080 patients atteints de paludisme (âge : $13,1 \pm 14,0$ ans ; rapport M : F=1,1), vivant principalement dans les zones rurales (n=688 ; 63,7%), ont été recrutés dans 64 établissements de santé situés sur les 10 sites sentinelles du PNLP sélectionnés pour l'étude (**Tableau 7.1**). Il n'y avait aucune différence de sexe (p=0,509) et de niveau d'éducation (p=0,163) entre les patients des zones rurales et urbaines. Par contre, en comparaison aux zones urbaines, les patients des zones rurales étaient plus âgés (âge moyen : $14,9 \pm 14,9$; p <0,001), moins couverts par une police d'assurance maladie (4,7% ; p <0,001), plus fréquemment catégorisés parmi les individus les plus défavorisés économiquement (163 des 219 patients du quintile des « plus défavorisés économiquement » ; p <0,001), et plus susceptibles d'être traités dans un établissement de santé privé à but lucratif (62,9% ; p <0,001).

La proportion de patients atteints de paludisme et titulaires d'une police d'assurance maladie était significativement plus faible parmi les femmes (14,3% et 19,9% ; p=0,017), parmi les patients d'âge adulte (12,5% et 19,2% ; p=0,008) ainsi que parmi les patients les moins scolarisés (0,0% et >13% ; p <0,02). En outre, significativement moins d'individus jouissant d'une police d'assurance maladie ont été observés en zones rurales (4,7% et 38,8% ; p <0,001), parmi ceux de la catégorie des « plus défavorisée économiquement » (seulement 0,2% et > 12% ; p <0,001) ainsi que parmi ceux ayant eu recours aux soins pourvus par des établissements de santé privés à but lucratif (11,6% et 25,9% ; p <0,001) (**Tableau 7.2**).

Tableau 7.1. Caractéristiques socio-économiques de base des patients atteints de paludisme non compliqué en RDC

Caractéristiques	Région rurale n=688		Région urbaine n=392		p-value
	n	%	n	%	
Genre					0.509
Femme	358	52	195	49.7	
Homme	330	48	197	50.3	
Niveau d'éducation (n=257 ; âge ≥18 ans)					0.163
Pas d'instruction	31	14.6	7	9.3	
Niveau primaire	36	17	8	10.7	
Niveau secondaire	117	55.2	44	58.7	
Niveau universitaire ou supérieur	28	13.2	16	21.3	
Tranche d'âge (années)*					<0.001
[0-5[	244	35.5	146	37.2	
[5-15[	187	27.2	152	38.8	
≥15	257	37.4	94	24	
Quintile de l'indice socio-économique					<0.001
Quintile 1 « les plus défavorisés économiquement »	163	23.7	56	14.3	
Quintile 2 "très défavorisé économiquement"	94	13.7	125	31.9	
Quintile 3 « économiquement défavorisé »	151	21.9	65	16.6	
Quintile 4 « moins défavorisé économiquement »	151	21.9	68	17.3	
Quintile 5 "les moins défavorisés économiquement"	129	18.8	78	19.9	
Statut d'assurance maladie					<0.001
Oui	32	4.7	152	38.8	
Non	656	95.3	240	61.2	
Type d'établissement de santé					<0.001
Conventionnel	255	37.1	192	49.0	
Privé à but lucratif	433	62.9	200	51.0	

(*) L'âge moyen des patients des zones rurales et urbaines était respectivement de 14,9 ± 14,9 et 11,0 ± 12,1 ans (p<0,001)

Tableau complet accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>

Connaissances, attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme chez les impaludés en RDC

Bien que la plupart des personnes interrogées connaissent le principal mode de transmission du paludisme (piqûre de moustique : 83,1%), il persistait encore celles qui n'en étaient toujours pas au courant (7,1%) ou celles qui évoquaient encore des modes de transmission incorrects (11,5%) tels que la transmission via de l'eau de boisson non potable, la sorcellerie, le manque d'hygiène et d'assainissement, la nourriture contaminée et les piqûres d'insectes divers. La fièvre (84,9%), les maux de tête (47,3%), les frissons (33,8%) et la douleur généralisée (22,3%) étaient les

symptômes du paludisme les plus couramment évoqués par les répondants. Les moustiquaires de lit ont été évoquées comme la méthode la plus efficace de prévention du paludisme (84,4%). Toutefois, 7,3% des personnes interrogées étaient toujours convaincues qu'il n'existait pas de méthode de prévention efficace, tandis que 1,1% d'entre elles n'étaient toujours pas au courant d'une approche de prévention quelconque. Dans l'ensemble, les répondants des zones rurales avaient une meilleure connaissance des modes de transmission du paludisme et des méthodes de prévention ($p < 0,001$) (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). Des moustiquaires de lit étaient disponibles dans la plupart des ménages des répondants (environ 90%) et avaient été acquises principalement au cours des trois années précédant l'enquête (dans environ 95%) (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). Cependant, seulement 76,7% des patients (81,7% parmi les enfants de moins de 5 ans) déclaraient avoir dormi sous une moustiquaire la nuit précédant l'enquête.

Comportements adoptés pour la quête de soins durant les épisodes de paludisme en RDC

Plus de la moitié des patients (57,8%) ont eu au moins un épisode de paludisme au cours de l'année écoulée en plus de l'épisode diagnostiqué au moment de l'enquête. Le nombre moyen d'épisodes de paludisme par participant rapportés en un an était de $2,7 \pm 1,6$. L'épisode de paludisme le plus récent rapporté par les participants remontait à $3,7 \pm 2,7$ mois en moyenne avant l'enquête, mais 19,0% d'entre eux n'avaient pas été testés pour le paludisme alors que 6,7% n'avaient pris aucun médicament antipaludique à cette occasion. Au cours de l'épisode diagnostiqué au moment de l'enquête, les patients avaient perdu $3,3 \pm 1,8$ jours, ce qui représentait environ la moitié de la durée totale de la maladie (~ six jours) et se produisait principalement au stade pré-hospitalier. A l'arrivée à l'hôpital, la majorité des patients (68,7%) avaient déjà tenté de soigner leur maladie. Ces traitements au stade pré-hospitalier provenaient principalement du secteur informel (~ 72% des

cas), y compris un antipaludique dans près d'un cas sur quatre (26,3%) (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>).

Tableau 7.2. Caractéristiques socio-économiques des patients impaludés titulaires d'une police d'assurance maladie en RDC

Les caractéristiques	Police d'assurance maladie				p-value
	Oui		Non		
	n	%	N	%	
Genre					
Féminin	79	14.3	474	85.7	Réf.
Masculin	105	19.9	422	80.1	0.017
Groupe d'âge des patients					
Adultes	44	12.5	307	87.5	Réf.
Jeunes	140	19.2	589	80.8	0.008
Niveau d'instruction (n=257; âge ≥18 ans)					
Non instruit	0	0.0	38	100.0	Réf.
Niveau primaire	3	6.8	41	93.2	0.241
Niveau secondaire	21	13.0	140	87.0	0.016
Niveau universitaire ou supérieur	12	27.3	32	72.7	0.002
Zone de résidence					
Zone rurale	32	4.7	656	95.3	Réf.
Zone urbaine	152	38.8	240	61.2	<0.001
Quintile de l'indice socio-économique					
Quintile 1 « les plus défavorisés économiquement »	2	0.9	217	99.1	Réf.
Quintile 2 "très défavorisés économiquement"	59	26.9	160	73.1	<0.001
Quintile 3 « économiquement défavorisés »	26	12.0	190	88.0	<0.001
Quintile 4 « moins défavorisés économiquement »	37	16.9	182	83.1	<0.001
Quintile 5 "les moins défavorisés économiquement"	60	29.0	147	71.0	<0.001
Type d'établissement de soins de santé					
Conventionnel	106	25.9	303	74.1	Réf.
Privé à but lucratif	78	11.6	593	88.4	<0.001
Tous les patients					
Patients	184	17.0	896	83.0	-

Fardeau social et qualité de vie au cours d'un épisode de paludisme non compliqué en RDC

Plus de la moitié des patients (> 50%) avec des épisodes de paludisme non compliqués ont signalé des problèmes modérés à extrêmes ayant trait aux différentes dimensions de l'HRQL définies par le questionnaire EQ-5D-3L. Ces problèmes signalés pendant les épisodes de paludisme étaient plus fréquents dans les zones urbaines que dans les zones rurales, en particulier à travers les dimensions liées aux soins personnels, à l'activité habituelle et à l'anxiété ou la

dépression ($p < 0,001$) (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). Les patients atteints de paludisme ont rapporté une moyenne de $0,36 \pm 0,2$ DW sur l'EQ VAS et un score moyen de $0,62 \pm 0,3$ d'indice EQ-5D. Les modèles linéaires généralisés prédisaient un DW significativement accru chez les patients dépourvus de la couverture par une police d'assurance maladie ($p=0,005$) tandis que les scores moyens de l'indice EQ-5D étaient significativement plus faibles chez les jeunes patients ($p < 0,001$), chez ceux non couverts par une assurance maladie ($p < 0,001$) et ceux résidant dans les zones rurales ($p < 0,009$) (**Tableau 7.3; Tableau 7.4**).

Chaque épisode de paludisme avait entraîné une absence de $1,2 \pm 1,1$ personnes (y compris patients et proches) de leurs activités sociales. Sur 351 patients (32% du total des patients) qui étaient économiquement actifs (EA, > 15 ans), 239 (68%) s'étaient absentes des activités quotidiennes (c.-à-d. l'école ou le travail) en raison de leur maladie. En outre, les membres de la famille de 918 patients (85% de tous les patients) ont dû interrompre leurs activités économiques en raison des besoins des patients en matière de soins antipaludiques. Un épisode de paludisme avait causé une perte moyenne de $3,1 \pm 2,2$ jours chez les patients EA et de $3,4 \pm 2,1$ jours chez les proches EA (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). Un modèle linéaire généralisé à variables multiples a pu prédire que le temps perdu accumulé par les patients EA était considérablement accru chez les patients résidant dans les zones rurales ($p < 0,001$), chez ceux non couverts par une assurance maladie ($p=0,049$) et chez ceux ayant un indice de DW élevé ($p < 0,001$) (**Tableau 7.5**).

Coûts économiques des épisodes de paludisme non compliqué en RDC

Les coûts totaux associés à 1080 épisodes de paludisme non compliqués dans notre enquête étaient de 39 204 USD : 18 025 USD (46,0%) qui correspondaient aux coûts directs et 21 125 USD (54,0%) aux coûts indirects (**Tableau 7.6**). Les coûts moyens s'élevaient à 36,3 USD par épisode, 16,7 USD étant des coûts directs et

19,6 USD, des coûts indirects. Étant donné que les patients avaient connu 2,7 épisodes de paludisme par an, le coût annuel du paludisme a été estimé à 98 USD par personne en moyenne. Les coûts indirects associés aux pertes de temps dues au paludisme chez les patients (15 707 USD) étaient plus élevés que les coûts encourus par leurs proches (5 409 USD) tandis que les coûts de traitement (6 296 USD) et les coûts de suivi (7096 USD) représentaient la plus grande part des coûts directs (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). Les coûts économiques totaux pour l'année 2017 au niveau national ont été estimés à 503 837 635 USD, avec un intervalle d'incertitude de 492 664 040 USD à 515 094 408 USD (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>).

Tableau 7.3. Comparaison du score de l'indice EQ-5D dans différentes catégories de patients atteints de paludisme non compliqué en RDC*

Variable	n	Moyenne (SD)	p-value
Tous les patients	1080	0.62 (0.26)	-
Tranche d'âge			
Patients adultes	351	0.65 (0.25)	<0.001
Jeunes patients	729	0.61 (0.27)	
Couverture d'assurance maladie			
Oui	184	0.71 (0.16)	<0.001
Non	896	0.61 (0.27)	
Type d'établissement de santé			
Conventionnel	447	0.6 (0.3)	0.144
Privé à but lucratif	633	0.65 (0.23)	
Résidence			
Zone rurale	688	0.62 (0.23)	0.009
Zone urbaine	392	0.63 (0.27)	
Quintile de l'indice socio-économique			
Quintile 1 « les plus défavorisés économiquement »	219	0.62 (0.26)	0.222
Quintile 2 "très défavorisés économiquement"	219	0.62 (0.25)	
Quintile 3 « économiquement défavorisés »	216	0.61 (0.28)	
Quintile 4 « moins défavorisés économiquement »	219	0.62 (0.25)	
Quintile 5 "les moins défavorisés économiquement"	207	0.65 (0.26)	
Le genre			
Femme	553	0.63 (0.27)	0.451
Homme	527	0.62 (0.25)	

(*) SD : Ecart-type

Tableau 7.4. Modèle bêta de régression linéaire généralisée pour le poids de désutilité (DW) au cours du paludisme non compliqué en RDC

Variable	n	Moyenne (SD)	MR [CI95%]	p-value
Le genre				
Homme	527	0,36 (0,20)	Réf	-
Femme	553	0,37 (0,20)	1,0 [0,9; 1,1]	0,654
Age (Années)	1080	0,36 (0,20)	0,9 [0,9; 1,0]	0,211
Résidence				
Zone rurale	688	0,36 (0,20)	Réf	-
Zone urbaine	392	0,37 (0,21)	1,1 [0,9; 1,1]	0,126
Couverture d'assurance maladie				
Oui	184	0,32 (0,18)	Réf	-
Non	896	0,37 (0,20)	1,2 [1,0; 1,3]	0,005
Quintile de l'indice socio-économique				
Quintile 1 « les plus défavorisés économiquement »	219	0,35 (0,19)	Réf	-
Quintile 2 "très défavorisés économiquement"	219	0,36 (0,20)	1,1 [0,9; 1,2]	0,389
Quintile 3 « économiquement défavorisés »	216	0,37 (0,20)	1,1 [0,9; 1,2]	0,118
Quintile 4 « moins défavorisés économiquement »	219	0,38 (0,21)	1,1 [1,0; 1,3]	0,019
Quintile 5 "les moins défavorisés économiquement"	207	0,36 (0,20)	1,0 [0,9; 1,2]	0,673
Type d'établissement de santé				
Conventionnel	447	0,36 (0,20)	Réf	-
Privé à but lucratif	633	0,37 (0,20)	1,1 [0,9; 1,1]	0,117

(*) CI95%, Intervalle de confiance à 95% ; SD, Ecart-type ; MR : ratio moyen

La PSA multi-directionnelle, considérant le nombre total d'épisodes de paludisme non compliqués en RDC et tenant compte de l'incertitude de tous les paramètres de coût pertinents en même temps, a constaté que les limites d'incertitude (2,5% et 97,5%) pour le coût moyen par épisode de paludisme se situaient entre 35,5 USD et 37,2 USD (Accessible sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>). L'évaluation de l'incertitude des paramètres individuels du coût économique des soins (PSA uni-directionnelle) a montré que le temps perdu en raison du paludisme induisait l'essentiel de l'incertitude du coût moyen par épisode de paludisme, avec des intervalles d'incertitude compris entre 35,9 USD et 36,6 USD en tenant compte du temps perdu par les patients EA et 35,6 USD et 36,8 USD pour le temps perdu par les parents EA des patients (2^{ème} et 3^{ème} barre colorée sur la **Figure 7.2**). Les intervalles d'incertitude étaient plus étroits avec le coût de la consultation initiale, le coût du traitement, la zone de résidence, les tentatives de traitement au stade pré-hospitalier et le coût du diagnostic (de la 4^{ème} à la 8^{ème} barre sur la **Figure 7.2**). Le

type d'établissement de santé était le paramètre le moins influent sur le coût économique d'un épisode de paludisme non compliqué.

Tableau 7.5. Modèle de régression linéaire généralisée pour le temps perdu chez les individus économiquement actifs (≥ 15 ans) atteints de paludisme non compliqué en RDC*

Variable	n	Temps moyen (SD)	Model multivariable final	
			MR [95%CI]	P-value
Le genre				
Homme	143	3,6 (2,7)	-	
Femme	208	3,8 (2,9)	-	
Age (Années)	351	3,7 (4,9)	1,0 [1,0; 1,0]	0,237
Résidence				
Zone urbaine	94	4,1 (1,8)	Réf,	
Zone rurale	257	2,6 (3,2)	1,5 [1,3; 1,8]	<0,001
Couverture d'assurance maladie				
Oui	44	2,6 (1,9)	Réf,	
Non	307	3,9 (2,9)	1,2 [1,0; 1,6]	0,049
Quintile de l'indice socio-économique				
Quintile 1 « les plus défavorisés économiquement »	55	3,9 (2,9)	-	
Quintile 2 "très défavorisés économiquement"	46	4,1 (3,0)	-	
Quintile 3 « économiquement défavorisés »	70	4,2 (3,1)	-	
Quintile 4 « moins défavorisés économiquement »	82	3,8 (2,8)	-	
Quintile 5 "les moins défavorisés économiquement"	98	3,1 (2,3)	-	
Type d'établissement de santé				
Privé à but lucratif	219	3,7 (2,8)	-	
Conventionnel	132	3,8 (2,9)	-	
Poids de désutilité	351	3,7 (4,9)	3,0 [2,0; 4,5]	<0,001

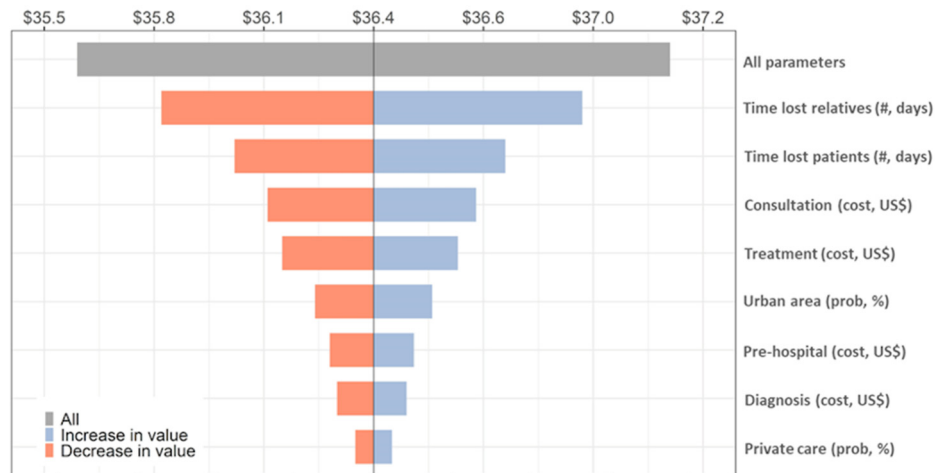


Figure 7.2. Diagramme en tornade de l'analyse probabiliste de sensibilité (PSA) des coûts moyens par épisode palustre simple en RDC.

La barre grise montre l'intervalle d'incertitude des coûts moyens en calculant l'incertitude de tous les paramètres (PSA multi-directionnelles). Les barres colorées montrent l'intervalle d'incertitude des coûts moyens en calculant l'incertitude d'un paramètre individuel à la fois (PSA unidirectionnelle)

Tableau 7.6. Coûts économiques totaux associés au paludisme non compliqué du point de vue du patient, estimés à partir de l'enquête en RDC

Catégorie de coût	n	Coût total (USD)	Coût par épisode (USD)	SD
Coût pour tous les participants				
Coûts totaux	1080	39,204	36.3	19.1
Coûts directs	1080	18,025.2	16.7	11.8
Coûts indirects	1080	21,124.8	19.6	12.8
Coûts totaux par âge				
Patients adultes	351	14,067.1	40.1	20.2
Jeunes patients	729	25,136.5	34.4	18.3
Coûts totaux par zone				
Zones rurales	688	25,359.3	36.9	18.6
Zones urbaines	392	13,844.2	35.3	19.8
Coûts totaux par établissement				
Établissement de santé conventionnel	447	16,795.4	37.6	21.2
Établissement de santé privé à but lucratif	633	22,408.1	35.4	17.3

7.5. Discussion

Cette étude a évalué le fardeau socio-économique du paludisme non compliqué en RDC, le deuxième pays le plus touché au monde. Les coûts totaux estimés pour les 13 863 021 épisodes de paludisme non compliqué enregistrés par le PNLP dans le pays en 2017 étaient de 503 837 635 USD, soit environ 6% du produit intérieur brut (PIB) du pays pour cette année. Les coûts moyens encourus par le patient et ses proches par épisode palustre étaient de 36,3 USD (variant entre 35,5 USD et 37,1 USD), soit près de 7 fois plus élevé que le salaire minimum quotidien national. Ainsi donc, en conformité avec des observations faites dans d'autres zones endémiques [271, 293-295], le paludisme non compliqué pourrait entraîner un épuisement substantiel des ressources et une perte considérable des revenus au niveau familial, devenant une cause importante de pauvreté en RDC. Dans l'ensemble, les estimations de coûts ont montré une variabilité limitée. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette homogénéité des coûts rapportés des épisodes de paludisme non compliqués. Cela pourrait être un reflet de la frange étroite d'altérations cliniques qui sous-tendent le paludisme non compliqué, par rapport aux formes de paludisme sévère qui sont plus hétérogènes en termes de gravité et de variabilité des symptômes [274]. Cela pourrait également être la résultante des efforts de réglementation de la politique nationale de lutte contre le paludisme.

Plus de la moitié des coûts (54,5%) correspondaient aux coûts indirects encourus par les patients économiquement actifs et les membres de leur famille qui étaient astreints à interrompre leurs activités quotidiennes pour se faire soigner (~ 20 USD par épisode sur la base du salaire minimum). Les interruptions d'activités quotidiennes (c'est-à-dire, école ou travail) pour raison de maladie ou de dispensation des soins antipaludiques étaient fréquentes parmi les patients EA (68%) et leurs proches (85%). Un épisode de paludisme entraînait une perte d'environ trois jours pour les patients EA (équivalant à 15,4 USD en moyenne) et une perte de trois jours et demi supplémentaires (équivalant à 17,1 USD en

moyenne) accumulés dans les familles par les proches du patient. Ainsi, comme cela a déjà été signalé dans d'autres pays africains, le paludisme non compliqué affectant un patient conduit en théorie toute sa famille à des pertes de productivité dues à l'absentéisme aux activités quotidiennes [281, 296, 297]. La prise en compte de la récurrence des épisodes de paludisme chez chaque participant (~ 3 épisodes par an) suggère dans quelle mesure le paludisme contribue à l'appauvrissement des familles en RDC. La pauvreté, à son tour, a le potentiel de générer et de maintenir des conditions perpétuant la transmission du paludisme dans la population [3, 271, 272, 275, 296]. Par conséquent, des efforts importants en termes de politiques de soins de santé et de mesures socio-économiques doivent être mis en œuvre pour briser le cercle vicieux entre pauvreté et paludisme qui menace la population de la RDC.

La durée du temps perdu en raison de la maladie dans l'étude s'est produite principalement au stade pré-hospitalier, et cela s'est avéré être le paramètre qui avait le plus d'influence sur les coûts moyens par épisode de paludisme en RDC. Ceci est compréhensible car des observations cohérentes sur des patients atteints de paludisme non compliqué en zones endémique ont identifié des pertes de temps plus longues en raison d'un diagnostic tardif du paludisme, conduisant potentiellement à un état clinique plus compromis des patients nécessitant un temps de récupération plus long, et donc des coûts de soins plus élevés [272, 275, 294, 298-300]. En outre, de fréquentes tentatives thérapeutiques ont eu lieu au stade pré-hospitalier, reposant sur des médicaments provenant principalement du secteur informel (par exemple, l'automédication, les vendeurs des magasins pharmaceutiques, les vendeurs ambulants de médicaments et les guérisseurs traditionnels) qui sont apparus comme le choix de première ligne dans la quête des soins contre le paludisme. En RDC, le secteur informel ne bénéficie pas des paquets d'intervention du PNLP (par exemple, l'appui en formation et intrants de diagnostic ou de traitement) et peut être une source de mauvaise gestion des cas avec risque d'augmentation de la morbi-mortalité et même l'émergence d'une

pharmaco-résistance qui pourrait davantage augmenter les coûts associés au paludisme [299, 300]. Par conséquent, les stratégies visant à réduire le temps perdu sont probablement cruciales pour réduire le fardeau économique de la maladie. Dans la population étudiée, ces stratégies devraient cibler spécifiquement les patients vivant dans les zones rurales, ceux n'étant pas couverts par une police d'assurance maladie ou ceux ayant eu un indice de DW plus lourd qui avaient été identifiés comme étant les catégories susceptibles de subir une perte de temps plus importante au cours d'épisodes de paludisme.

Les coûts directs (45,6% des coûts totaux) payés de leur poche par les familles comprenaient principalement les coûts de traitement et les coûts de suivi. En RDC, le PNLP fournit gratuitement des médicaments antipaludiques et des tests de dépistage du paludisme à tous les patients accédant aux établissements de santé [35, 40]. Bien qu'il s'agisse déjà d'une mesure salubre pour la population, les décideurs en matière de santé devraient être exhortés à subventionner entièrement les soins contre le paludisme comme ils le font pour d'autres maladies infectieuses endémiques dans le pays (par exemple, la tuberculose, la lèpre, le VIH) [301]. A défaut de cela, une mesure intermédiaire consisterait à étendre le soutien aux soins antipaludiques à des coûts supplémentaires (par exemple, les frais de consultation médicale). Cependant, contrairement aux règles en vigueur, il est apparu que des honoraires étaient encore exigés des patients pour accéder aux antipaludiques (environ 3,5 USD par épisode) et au diagnostic du paludisme (environ 0,5 USD par épisode), qui sont censés être gratuits. Par conséquent, des efforts pour une réglementation plus restrictive des prix et des services de soins aux patients atteints de paludisme sont nécessaires pour normaliser et réduire efficacement les coûts directs payés par les patients à leur arrivée dans les hôpitaux.

Des études antérieures provenant de différents pays endémiques ont rapporté diverses estimations du coût de la maladie chez les patients atteints de paludisme non compliqué qui sont similaires ou même significativement différentes des résultats présents, allant de 180 USD en Amazonie péruvienne à 4,9 USD au

Ghana comme coûts totaux par épisode [281, 293, 294, 302-306]. Les différences notées entre les estimations de coûts peuvent être liées aux approches méthodologiques appliquées ainsi qu'aux caractéristiques socio-économiques des régions [293-295]. Par exemple, les coûts indirects peuvent différer considérablement dans le même pays ou entre différents pays si les estimations sont basées sur le PIB ou le salaire minimum [294]. Les coûts indirects associés au paludisme dans la présente étude auraient été quatre fois plus faibles si les estimations étaient basées sur le PIB (~ 1,3 USD par jour et par habitant) au lieu du salaire minimum (~ 5 USD par jour) [307]. Les différences constatées entre les estimations de coûts peuvent également être liées aux inégalités dans le déploiement et l'organisation des politiques de santé entre les régions [293-295]. Dans cette étude, les coûts associés au paludisme peuvent donc avoir été sous-estimés puisque les sites de collecte de cette étude ont été sélectionnés pour leur accessibilité relative et leur couverture plus importantes par les activités du PNLP. Il est donc concevable que dans les zones où l'accès aux établissements de santé est plus limité, la population pourrait subir une charge de paludisme beaucoup plus lourde et un coût plus élevé de la maladie.

Toutes les dimensions sociales de l'EQ-5D-3L (c.-à-d. la mobilité, les soins personnels, les activités habituelles, la douleur ou l'inconfort et l'anxiété ou la dépression) étaient modérément ou gravement altérées chez environ la moitié des patients atteints de paludisme non compliqué. L'indice DW et le score EQ-5D ont été estimés pour évaluer l'ampleur de la perte de santé associée à des issues de santé spécifiques au paludisme non compliqué. Les résultats obtenus montrent qu'un épisode de paludisme est associé à une mauvaise qualité de vie et à une forte désutilité en plus d'un fardeau économique élevé. Cependant, le DW moyen global de $0,36 \pm 0,2$ noté par patient atteint de paludisme non compliqué doit être considéré avec prudence étant donné qu'il ne peut être définitivement lié au paludisme et que le niveau de santé de base pour chaque patient (qui n'est pas nécessairement un niveau de VAS=100) était inconnu. De surcroît, à défaut des

normes établies pour la population congolaise, le score moyen de l'indice EQ-5D de $0,62 \pm 0,3$ a été déduit des préférences de santé du Zimbabwe. Un patient atteint de paludisme non compliqué qui ne bénéficiait pas d'une police d'assurance maladie (896 sur 1080 ; 82,9%) encourrait des coûts nettement plus élevés, une qualité de vie inférieure et une désutilité plus lourde tout en perdant plus de temps pendant la maladie. L'assurance maladie est une mesure de protection sociale consistant en un mécanisme de politiques publiques ou privées visant à prévenir, réduire et éliminer les vulnérabilités économiques et sociales à la pauvreté ou à la privation résultant de la maladie [273]. En 2017, de façon globale, seuls 7% et 1% environ de la population congolaise résidant respectivement dans les zones urbaines et rurales étaient couverts par des programmes formels d'assurance maladie organisés principalement par leurs employeurs (>75%) [273]. Des proportions plus importantes de patients atteints de paludisme (4,7% dans les zones rurales et 38,8% dans les zones urbaines) ont bénéficié d'une assurance maladie dans la présente étude. La différence constatée serait due aux mécanismes spécifiques de réduction des coûts des soins antipaludiques mis en œuvre par le PNLP en plus de l'assurance maladie générale [35]. Cependant, ces niveaux de couverture nécessitent une amélioration. En outre, la répartition des sujets titulaires de telles polices d'assurance maladie révèle l'existence des problèmes d'équité au détriment de la population vivant dans les zones rurales, des personnes les plus économiquement défavorisées, des femmes et de ceux ayant le plus faible niveau d'instruction. Dans l'ensemble, à l'instar des observations faites sur d'autres aspects du système de santé de la RDC [35, 121], cette étude indique que les soins de santé contre le paludisme dépendent fortement des paiements directs des patients malgré une aide multilatérale substantielle au PNLP. La grande part de la population non couverte par aucun mécanisme d'assurance maladie encoure des dépenses personnelles catastrophiques, en particulier lorsqu'elle fréquente le secteur privé ou informel pour se faire soigner. Les conditions de soins et la qualité de vie des patients atteints de paludisme peuvent donc être négativement affectées chez ceux

qui ne détiennent pas de polices d'assurance maladie en raison des coûts élevés des soins de santé qui peuvent conduire à l'utilisation de soins ou de pratiques moins efficaces et retarder le diagnostic et le traitement correct de la maladie [38, 274]. Les stratégies de promotion de l'assurance maladie et de l'accès aux services de soins contre le paludisme s'avèrent donc cruciales afin de réduire la charge de morbidité dans le pays. En outre, les patients vivant dans les zones rurales supportaient un fardeau socio-économique du paludisme non compliqué disproportionnellement plus élevé comparé à celui des résidents des zones urbaines car ils perdaient plus de temps à cause de la maladie, avaient un accès limité à l'assurance maladie et représentaient la plupart des patients les plus économiquement défavorisés. Cette observation est indicative de la situation globale du système de santé du pays. En fait, des décennies de non-gouvernance avaient entraîné l'effondrement de l'État et de l'économie en RDC avec, comme corolaires, un manque de financement public et un faible leadership national, y compris au sein du système de santé [121]. Cette situation avait conduit les décideurs sanitaires à encourager la création, par des tiers, de points de prestation de soins de santé privés à but lucratif et non lucratif et leur intégration dans le système de santé pour combler l'incapacité du gouvernement à répondre aux besoins de santé de la population [38, 121, 301]. L'expansion du secteur privé de la santé est plus prononcée dans les zones rurales où les installations de l'État sont moins nombreuses que dans les zones urbaines. Le PNLP dépend donc fortement des prestations de soins de santé par des entités privées, pour la mise en œuvre des politiques nationales de lutte contre le paludisme et des activités connexes dans différentes zones de santé rurales [38, 121, 301]. Cela peut expliquer pourquoi, tout au long de cette étude, les patients atteints de paludisme vivant en milieu rural ont recouru presque exclusivement aux soins issus du secteur privé. En outre, un déploiement inefficace de la main-d'œuvre est reconnu dans le système de santé de la RDC avec une surabondance de ressources humaines pour la santé dans les zones urbaines par rapport aux zones rurales où la population a accès à moins

d'établissements de santé, plus éloignés géographiquement, avec des travailleurs moins qualifiés, une prestation de services limitée et des cliniques manquant fréquemment de matériel [121]. Bien qu'intégrées dans l'offre nationale du système de santé, ces cliniques privées à but lucratif sont en réalité largement non réglementées et fournissent le plus souvent des services de santé de qualité inconnue, augmentant le coût des soins de santé pour la population et retardant les références hospitalières lorsqu'elles sont nécessaires [38]. L'efficience et l'efficacité de la prestation des soins de santé sont par conséquent affectées, même pour les services de santé librement accessibles tels que ceux dévolus au traitement du paludisme non compliqué. Il n'est donc pas surprenant que la qualité de vie des patients atteints de paludisme non compliqué ait été plus affectée dans les zones rurales. Ces inégalités géographiques et sociales avaient été précédemment mises en évidence dans la population congolaise par l'EDS-RDC II 2013-2014 et devraient être remédiées par des politiques sociales et des stratégies de santé publique adaptées [20]. Des situations similaires ont été signalées dans plusieurs pays africains, dont l'Éthiopie et le Mozambique [277, 308].

Si des subventions accrues pour la prise en charge des cas de paludisme et un meilleur accès aux services de soins contribueront certainement à réduire la charge de morbidité directe sur les familles, des mesures plus générales sont nécessaires pour réduire efficacement le coût du paludisme dans le pays dans une perspective à plus long terme. Ces mesures comprennent toute politique de lutte ou stratégie de prévention pouvant contribuer à réduire le nombre de cas et donc les coûts associés au paludisme. Par conséquent, davantage d'efforts pour améliorer les conditions socio-économiques, l'hygiène et l'assainissement devraient être déployés dans le pays. De même, les efforts de communication sanitaire devraient figurer en bonne place dans les stratégies de réduction du fardeau socio-économique du paludisme via l'augmentation des connaissances et la promotion de bonnes pratiques contre le paludisme [309]. Sans surprise, la grande majorité des répondants avaient de bonnes connaissances de base sur le paludisme (voie de transmission, mode de

prévention et principaux symptômes) et disposait des moustiquaires dans leurs ménages respectifs, en particulier dans les zones rurales. Cela est probablement dû aux campagnes intensives lancées ces dernières années dans tout le pays par le PNLP et les organisations communautaires qui ont été plus prononcées en milieu rural, probablement en reconnaissance des défis supplémentaires auxquels sont confrontés les patients dans ces régions à plus forte prévalence du paludisme [4, 36]. Ces efforts de sensibilisation devraient être poursuivis et même intensifiés dans le secteur des connaissances et des pratiques identifiées comme présentant des lacunes supplémentaires à combler (par exemple, la connaissance des modes de transmission, la prescription de médicaments du secteur informel comme traitements de premier choix) en milieu aussi bien rural qu'urbain. L'exposition au paludisme étant élevée sur l'étendue nationale, les campagnes d'amélioration de la couverture et de l'utilisation des MILDA dans les ménages doivent également être maintenues et même renforcées afin de consolider les performances atteintes [4, 38, 310].

Limites

Cette étude présentait certaines limites. Premièrement, les analyses ont été limitées aux dépenses perçues selon la perspective du patient avec le risque de sous-estimer le véritable coût de la maladie étant donné que cette approche centrée sur le patient n'inclut pas les coûts du fournisseur de soins de santé. A titre illustratif, les dépenses couvertes par le PNLP (par exemple, la formation de cliniciens, les tests de diagnostic rapide et les médicaments antipaludiques) n'ont pas été incluses dans les estimations des coûts des soins. Deuxièmement, seuls les patients atteints de paludisme symptomatique non compliqué ont été pris en compte. Dans les cas de paludisme grave, le fardeau individuel de la maladie devrait être beaucoup plus lourd que celui noté ici en raison de coûts de traitement potentiellement plus élevés, d'une qualité de vie plus altérée et d'une durée de la maladie plus longue avec la possibilité de complications graves ou même mortelles [274, 281-283].

Troisièmement, la conception de l'étude était basée sur des entrevues avec les patients impaludés et leurs proches et, par conséquent, ne pourrait être épargnée par les biais de mémoire et de sélection. Quatrièmement, cette étude a fourni des preuves empiriques basées sur des patients fréquentant des établissements de santé et qui peuvent être différents de la population générale. Les informations précises sur les revenus individuellement perdus en raison de la maladie auraient pu renforcer les résultats de cette étude. Cependant, compte tenu du veto de confidentialité exigée par les participants, ces informations importantes n'ont pu être obtenues. Les estimations de coûts étaient par conséquent basées sur le salaire minimum pour les personnes économiquement actives, définies comme étant celles qui étaient âgées de ≥ 15 ans. Bien que cette estimation empirique soit autorisée pour l'évaluation de la main-d'œuvre [288], elle peut avoir biaisé les estimations faites. Enfin, concernant la qualité de vie des patients, les normes de la population (c.-à-d. chez les personnes en bonne santé) et la qualité de vie de base des patients (c.-à-d. avant la maladie) n'étaient pas disponibles au moment de cette étude. Par conséquent, la prudence devrait être de mise dans l'interprétation des atteintes de la qualité de vie ayant été notées et qui pourraient n'avoir pas été spécifiquement dus à l'épisode de paludisme en cours.

7.6. Conclusion

Malgré les limites mentionnées ci-dessus, cette étude met en évidence des coûts élevés des soins et un fardeau considérable du paludisme non compliqué en RDC. Les résultats fournis seront utiles pour souligner la nécessité d'un soutien continu et pour solliciter un financement approprié de la part des organisations gouvernementales et non gouvernementales pour une lutte plus efficace contre le paludisme dans le pays. Cette étude a utilisé des informations factuelles pour préconiser de subventionner la prise en charge des cas de paludisme non compliqués par le biais de mécanismes d'assurance maladie en tant que politique

clé capable de réduire considérablement les dépenses personnelles des patients et de leur famille tout en améliorant sensiblement leur qualité de vie. Les catégories de patients identifiées comme étant associées à des coûts économiques accrus de la maladie dans cette étude seront essentielles pour la prise de décision, l'établissement des priorités et l'allocation des ressources des politiques de lutte antipaludique.

Contribution des auteurs

NS, ARA, BD et NKK ont conçu l'étude. NKK, DMY, BD, DMM, PZK, PDM, GLM, PDL, MPH, ARA et NS ont rédigé le protocole de l'étude. NKK, BD, PB, ARA et NS ont analysé les données et établi les chiffres. NKK, ARA et NS ont rédigé le manuscrit initial. NKK, DMY, BD, DMM, PZK, JLL, LK, PDM, GLM, PLD, PB, MPH, ARA et NS ont apporté une contribution majeure à la révision du manuscrit.

Remerciements

Nous remercions les membres du personnel des différents districts de santé et établissements de santé, ainsi que les patients des différents sites sentinelles du PNLP pour leur participation active et leur soutien lors de la conduite de l'enquête sur le terrain.

Accessibilité des données

Les données relatives à cette étude sont accessibles en ligne ensemble avec l'article publié, sur <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>.

CHAPITRE 8. EVALUATION DE LA FAISABILITE DE LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA RESISTANCE AUX ANTIPALUDIQUES EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO : ROLE, AVANTAGES ET DEFIS DE L'INTEGRATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE DANS LA POLITIQUE NATIONALE ANTIPALUDIQUE

Auteurs : Nadine Kayiba Kalenda, Doudou Yobi Malekita, Dieudonné Mvumbi Makaba, Brecht Devleesschauwer, Pius Kabututu Zakayi, Patrick DeMol, Georges Mvumbi Lelo, Marie-Pierre Hayette, Angel Rosas-Aguirre, Paul Lusamba Dikassa, Niko Speybroeck.

Article: Assessment of the feasibility of the epidemiological surveillance of resistance to antimalarial drugs in the Democratic Republic of Congo: Role, advantages, and challenges for integrating molecular markers in the national antimalarial policy
(Article sous presse)

8.1. Résumé

Contexte : Cette étude a fait un état des lieux des mécanismes de surveillance du paludisme pharmaco-résistant en République Démocratique du Congo et a évalué la faisabilité de l'intégration, dans la politique antipaludique nationale, d'une surveillance des parasites porteurs des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques.

Méthodes : Pour ce faire, alors qu'un tel système était implémenté à travers le pays, une étude qualitative a été diligentée de 2017 à 2021 au moyen d'entrevues avec divers intervenants dans la lutte antipaludique, des fouilles documentaires ainsi que d'observations participatives des activités. Les résultats ont été analysés selon une approche thématique déductive en suivant un schéma SWOT – Strengths

(Forces), Weaknesses (Faiblesses), Opportunities (Opportunités), and Threats (Menaces).

Résultats : La surveillance du paludisme pharmaco-résistant était perçue comme étant nécessaire par tous les interrogés, évoquant les tests d'efficacité thérapeutique (TET) comme étant la méthode privilégiée pour y parvenir. Toutefois, des activités relatives à cette surveillance étaient restées très limitées dans le pays. Le système nouvellement mis en place pour contribuer à résoudre ce déficit était jugé opérationnel en offrant une stratégie alternative aux TET, basée sur la détection des marqueurs moléculaires de la résistance. Les avantages évoqués au profit de ce système incluaient la capacité d'analyses massives en un temps relativement bref, la capacité de cartographier la résistance ou d'anticiper l'émergence de la résistance clinique dans la population. A l'opposé, des défis essentiellement d'ordre financier ou communicationnel en plus du défaut de corrélation avec les résultats cliniques qui est inhérent aux marqueurs moléculaires étaient évoqués comme s'opposant à la mise en œuvre durable du système.

Conclusion : En conclusion, le système mis en place pour la surveillance des résistances du *P. falciparum* par la détection des marqueurs moléculaires de résistance pourrait jouer un rôle important en santé publique dans le paysage national de la lutte antipaludique mais exige encore d'être consolidé. Il s'agit d'une solution intermédiaire vers le développement futur d'un système de surveillance intégrale du paludisme pharmaco-résistant censé combiner plusieurs méthodes pour optimiser les évidences à même de guider la politique antipaludique dans le pays. Les facteurs à potentiel positif ou défavorable mis à jour dans cette étude devraient servir de levier pour la mise en œuvre pérenne dudit système.

Mots-clés : Faisabilité ; Surveillance épidémiologique de la résistance ; Marqueurs moléculaires de résistance ; Lutte antipaludiques ; République Démocratique du Congo.

8.2. Introduction

Plus de 90% de la population de la République Démocratique du Congo (RDC) vit en zone de transmission élevée du paludisme [246]. Dans ce contexte, en absence d'un vaccin d'efficacité éprouvée, les traitements médicamenteux efficaces et les mesures de lutte anti-vectorielle sont la pierre angulaire de la lutte contre le paludisme [16]. Cependant, l'arsenal des molécules thérapeutiques reste globalement limité et la résistance aux médicaments antipaludiques constitue un obstacle majeur au succès potentiel des activités de lutte contre le paludisme [1]. L'émergence et la diffusion de cette résistance conduit inévitablement à des conséquences cliniques et épidémiologiques majeures dont une augmentation de la morbi-mortalité palustre, une augmentation des coûts de traitement ainsi qu'une pression plus importante sur des systèmes de santé préalablement fragilisés des pays d'endémie palustre [1, 9, 14, 207]. En RDC, la résistance aux médicaments antipaludiques est rapportée depuis plusieurs années, atteignant des fréquences élevées vis-à-vis de certains médicaments comme la chloroquine (CQ) et la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) [5]. Par ailleurs, plus récemment, l'émergence locale de la résistance à l'artémisinine (ART) ou sa diffusion à partir des pays voisins est devenue un scénario plausible. Cette résistance pourrait entamer les progrès importants enregistrés au cours de la dernière décennie après la mise à l'échelle de la prescription en première ligne des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) et de l'artésunate injectable pour le traitement du paludisme non compliqué et sévère, respectivement [14, 73, 82, 180]. La surveillance épidémiologique de la résistance du *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques est donc une nécessité urgente et devrait occuper une place importante dans la politique nationale de lutte contre le paludisme.

Trois catégories de méthodes existantes sont susceptibles d'être utilisées pour surveiller le paludisme pharmaco-résistant: les essais *in vivo* ou tests d'efficacité thérapeutique (TET), les tests *in vitro/ex vivo* et la détection des parasites porteurs

des marqueurs moléculaires de la résistance (MMR) aux médicaments antipaludiques [1, 11]. Chacune de ces approches présente des contraintes propres ainsi que des avantages et inconvénients qui doivent être pris en compte lors de sa mise en œuvre au sein des politiques de lutte antipaludique dans différents pays [11]. Bien que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande les essais cliniques *in vivo* comme étant la méthode de référence, elle autorise également l'utilisation des autres méthodes comme possibles alternatives [1, 41, 88]. Cependant, l'idéal serait d'utiliser une approche intégrée qui combinerait toutes ces méthodes pour apporter le maximum d'informations sur l'émergence et l'évolution de la résistance aux antipaludiques dans une population [11].

C'est ainsi que, faisant suite à des travaux préliminaires [204], un système de surveillance de la résistance aux antipaludiques a été mis en place en 2017 sur l'étendue de la RDC. Ce système était fondé notamment sur la détection des parasites porteurs des MMR. Les activités de surveillance lancées ont comporté plusieurs enquêtes de terrain [205, 207, 215]. La présente étude a eu pour objectif premier de faire un état des lieux des mécanismes existants au sein de la politique antipaludique nationale pour surveiller le paludisme pharmaco-résistant en RDC. Ensuite, elle a visé à évaluer la faisabilité du système de surveillance nouvellement établi en mettant en exergue les défis demeurant à relever, ainsi que les avantages et les rôles possibles que l'intégration de ce système pourrait jouer dans le paysage de la politique antipaludique en RDC.

8.3. Méthodes

Contexte d'étude

De 2011 à 2016, un travail pilote a été réalisé pour établir des outils techniques servant à détecter les parasites de *Plasmodium* encodant les MMR aux différents antipaludiques au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa (LBMFM/UNIKIN) en RDC [204]. En

2017, partant de ces travaux préceptes, un système de surveillance épidémiologique du paludisme pharmaco-résistant a été mis en œuvre grâce à un partenariat impliquant l'Université de Kinshasa, le PNLP, l'Université de Liège et l'Université catholique de Louvain. Ce partenariat a été conçu comme un projet de recherche pour le développement (intitulé PRD/PALU-UNIKIN) qui bénéficiait d'un financement de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur du Gouvernement de la Belgique (ARES) (<http://biomol.facmed-unikin.net/projet-de-recherche-pour-le-developpement-prd/>; consulté ce 20/07/2021). En mettant en réseau 64 structures de soins couvrant dix sites sentinelles de surveillance du paludisme en RDC, ce système avait pour objet principal d'assurer la surveillance à grande échelle de la résistance aux antipaludiques afin d'informer en temps réel les décideurs politico-sanitaires et la communauté scientifique.

L'architecture reconstituée du système de surveillance mis sur pied est représentée par la **Figure 8.1**. Ce système comporte ainsi une unité centrale établie au sein du LBMFM/UNIKIN, chargée de réaliser les activités suivantes : (i) la rédaction des protocoles de recherche ; (ii) la collecte des données ; (iii) les analyses moléculaires et microscopiques ; (iv) les analyses statistiques et épidémiologiques ; (v) le rapportage des données ; (vi) la gestion des données ; (vii) la vigilance et alerte ; (viii) le suivi et l'évaluation des activités ; (ix) la recherche scientifique intégrant un volet d'élaboration de nouvelles méthodes d'analyses moléculaires ; (x) ainsi que l'enseignement et la formation technique. Pour mener à bien ses activités, ladite Unité interagit avec divers partenaires nationaux et internationaux ainsi que les structures de collecte des échantillons biologiques situées sur dix sites sentinelles du PNLP et servant de points d'entrée périphériques des cas de paludisme. Cette Unité planifie ses enquêtes de terrain à mener au niveau périphérique et apporte son appui technique au PNLP en interagissant notamment avec les Coordinations provinciales et la Division de la Recherche Opérationnelle du PNLP. Après la mise en place de ce système de surveillance, des enquêtes de terrain ont été conduites périodiquement de 2017 à 2020 et les résultats diffusés (27

rapports internes, 4 articles scientifiques et 6 présentations dans des conférences nationales et internationales). Au cours de ces enquêtes, les agents de collecte avaient été recrutés parmi le personnel de soins des sites sentinelles et avaient suivi une formation préalable pour l'exécution de la collecte et de la transmission des données et échantillons de sang séchés sur papier filtre. Ces enquêtes avaient été menées aussi bien sur des sites ruraux d'accessibilité réduite (notamment Vanga, Bolenge, Karawa, Kalima, Fungurume, Kamina et Katana) que sur les grandes villes (notamment à Kinshasa, Lubumbashi et à Kisangani), en portant principalement sur les patients impaludés symptomatiques et, accessoirement, sur les femmes enceintes (**Figure 8.2**).

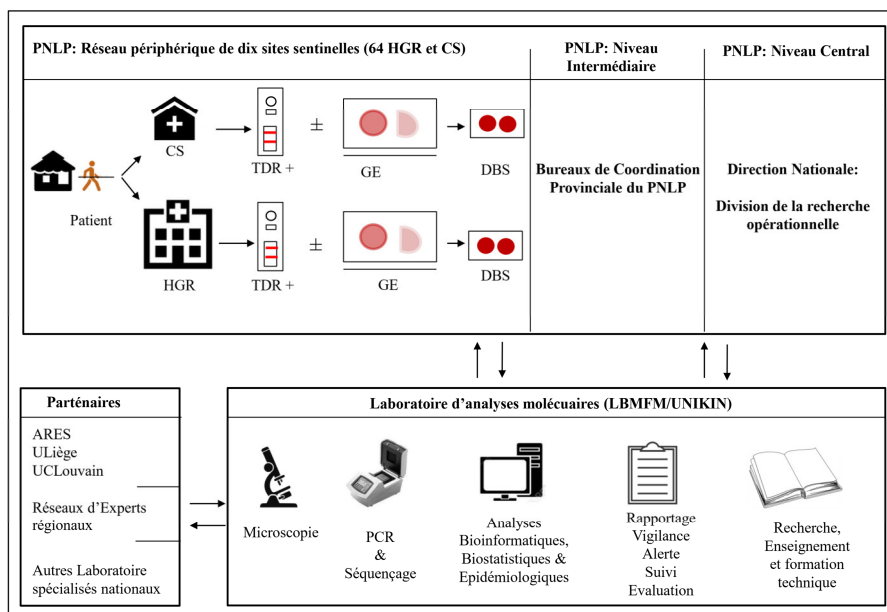


Figure 8.1. Schéma du fonctionnement du système de surveillance de la résistance aux antipaludiques en RDC tel que mis en place par le LBMFM/UNIKIN *.

(*) HGR : Hôpital Général de Référence ; CS : Centre de Santé ; PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ; DBS : « Dried blood spot » ; TDR : Test de diagnostic rapide ; GE : Goutte épaisse ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; ARES : Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur ; ULiège : Université de Liège ; UCLouvain : Université catholique de Louvain ; LBMFM/UNIKIN : Laboratoire de biologie moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa.

Conception de l'étude et échantillonnage

Il s'agit d'une étude qualitative à caractère exploratoire qui a été conduite de 2017 à 2021. Le choix des sites et une stratégie raisonnée d'échantillonnage ont été employés en consultation avec la direction nationale du PNLP. Les participants incluaient les informateurs-clés susceptibles de fournir les informations les plus pertinentes sur l'organisation éventuelle de la surveillance du paludisme résistant en RDC. Il s'agissait des points focaux thématiques et responsables des activités antipaludiques qui prestaient au moment de l'enquête aux différents échelons du PNLP ainsi qu'au niveau du LBMFM/UNIKIN.

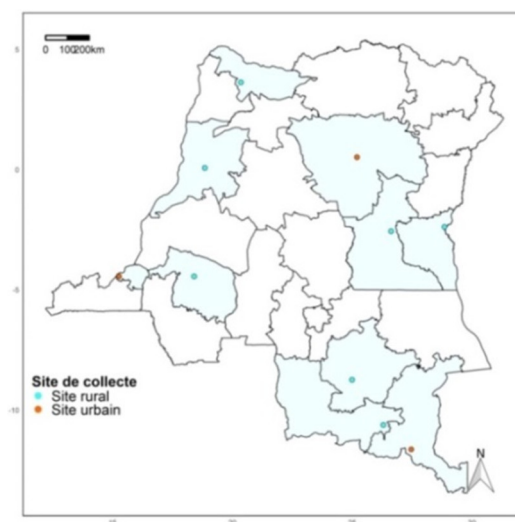


Figure 8.2. Sites sélectionnés pour la surveillance des parasites résistants aux antipaludiques en RDC.

Les points de couleur orange indiquent les sites urbains et ceux de couleur aquatique, les sites ruraux. Les aires ombrées représentent les provinces dont les sites ont servi à la surveillance, et celles non ombrées les provinces n'ayant pas été mises sous surveillance.

Procédures de collecte des données

Trois approches distinctes ont été combinées pour réaliser la collecte des données de cette étude, incluant : les entrevues des informateurs-clés, la revue documentaire

et l'observation participative des activités. Les guides utilisés pour cette collecte avaient été adaptés à partir de la boîte à outils du *Monitoring and Evaluation Capacity Assessment Toolkit*, MECAT (www.measureevaluation.org), destinés à l'évaluation des systèmes de surveillance des maladies (**Tableau S8.1**). Ainsi, les entrevues ont été conduites à l'aide d'un enregistreur audio et en ligne grâce à des outils électroniques créés au moyen des feuilles Google (<https://www.google.com/intl/fr/sheets/>). En parallèle, une revue de la documentation, relative aux activités de surveillance épidémiologique des résistances aux antipaludiques en RDC, a été menée afin éventuellement de corroborer les informations recueillies au cours des entrevues. A cet effet, les documents de la littérature grise et les publications scientifiques examinées ont été réunis à partir des ressources documentaires du PNLP, du LBMFM/UNIKIN et des moteurs électroniques (notamment PubMed). L'identification des documents pertinents pour l'objet en examen était fondée sur un guide ad hoc (**Liste S8.1**). Un examen documentaire secondaire a été conduit sur base d'autres documents référencés ou apparus lors des entrevues avec les différents participants. Enfin, une observation participative des activités menées sur les sites sentinelles a été conduite afin d'inspecter et d'analyser les éléments de la lutte antipaludique mis sous surveillance.

Analyse des données

Les statistiques descriptives ont été produites sur une feuille de calcul Excel 2016 (Microsoft Excel version 10, Microsoft, États-Unis). Les réponses aux différentes questions du guide des entrevues, les synthèses de la revue documentaire et les notes des observations des activités de terrain ont été regroupées selon les domaines d'évaluation préconisés par le MECAT (1. Organisation et capacités humaines ; 2. Leadership, gestion, partenariat et gouvernance ; 3. Travail et suivi des activités ; 4. Évaluation, recherche, supervision & utilisation des données) dans un seul document pour une analyse primaire. Chaque participant s'était vu attribuer

un code d'identification unique pour faciliter l'interprétation des données. Ensuite, une analyse thématique déductive des opinions des interrogés a été conduite et a permis de dégager et de classifier les thèmes émergents selon un schéma SWOT – Strengths (Forces), Weaknesses (Faiblesses), Opportunities (Opportunités), Threats (Menaces) – afin d'explorer les éventuels avantages et défis rencontrés par le système mis en place. Les thèmes-clés et les problèmes émergents pendant les entrevues ont été ensuite corroborés avec diverses sources documentaires et notes d'observations pour étoffer la description des résultats. Les récurrences pour chaque sujet ont ensuite été identifiées et des citations clés traduisant différents thèmes ont été sélectionnées pour illustrer les résultats. Les caractéristiques individuelles des participants ont été retirées avant la présentation pour préserver l'anonymat. Les citations venant des participants à l'étude ont été occasionnellement éditées pour corriger la grammaire ou pour permettre la lisibilité, tout en préservant le sens et le ton des commentaires.

Considérations éthiques

Cette étude a été conduite selon les préceptes éthiques de la Déclaration d'Helsinki garantissant le respect, la confidentialité et la liberté des participants. Une approbation préalable a été obtenue du Comité d'éthique de l'École de Santé Publique de l'Université de Kinshasa pour son déroulement (# : ESP MINESU 019/2016).

8.4. Résultats

Caractéristiques de base des interrogés

Parmi les 22 sujets interrogés, la plupart était de sexe masculin (86,4%) avec un âge professionnel d'au moins 5 ans dans des activités de lutte contre le paludisme (72,7%) et relevaient de l'obédience du PNLP (77,3%) (**Tableau 8.1**). Quatre thèmes principaux ont émergé de cette enquête, portant notamment sur la

perception du besoin de la surveillance de la résistance aux antipaludiques, la fonctionnalité du système de surveillance créé, les atouts et opportunités existants, ainsi que les faiblesses et menaces pouvant s'opposer à la mise en œuvre de ce système.

Tableau 8.1. Profil de base des sujets interrogés dans l'étude

Caractéristique*	n	%
Sexe M	19	86,4
Age professionnel dans le secteur de la lutte contre le paludisme		
< 5 ans	6	27,3
≥ 5ans	16	72,7
Plus haut niveau d'études atteint		
A1	13	59,1
L2 ou MD	2	9,1
Spécialisation médicale ou Master	2	9,1
PhD	5	22,7
Niveau d'intervention par rapport à la structure du PNLP		
Niveau périphérique du PNLP (sites sentinelles)	10	45,5
Niveau intermédiaire du PNLP (coordinations provinciales)	5	22,7
Niveau central du PNLP (direction nationale)	2	9,1
Partenaires du PNLP (LBMFM/UNIKIN, OMS, SANRU)	5	22,7

(*) A1 : graduat en sciences infirmières ; L2 : License ; MD : doctorat en médecine ; PhD : doctorat à thèse ; PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ; LBMFM/UNIKIN : Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé ; SANRU : Soins de Santé Primaire en Milieu Rural.

Etat des lieux des mécanismes de surveillance des résistances aux antipaludiques en RDC

Une idée centrale a émergé des entrevues reconnaissant la résistance aux antipaludiques comme une menace importante pour la santé de la population en RDC. Toutes les personnes interrogées ont soutenu que l'intégration des activités pour lutter contre cette résistance ou la prévenir est soit urgente, soit nécessaire ou soit avantageuse et pourrait aider à mieux préserver l'efficacité des traitements antipaludiques et à sauver des vies à travers le pays. Au décours des entretiens, de nombreuses personnes (18/22) ont explicitement proposé la conduite régulière d'un TET pour surveiller cette résistance en RDC.

« ... [Je propose de] *mesurer de façon prospective et régulière les réponses cliniques et parasitologiques adéquates auprès d'une population jugée non-immune souffrant du paludisme non compliqué* » (Informateur-clé alpha, Kinshasa).

Le TET a ainsi émergé comme étant la méthode de choix des interrogés, pour la surveillance épidémiologique de la résistance aux antipaludiques. A l'opposé, les autres moyens de surveillance de cette résistance restaient soit peu connues, soit entourés d'un certain scepticisme quant à leur utilité auprès de tous les interrogés (16/22). Certains interrogés l'ont exprimé comme suit :

« *Je ne sais pas vraiment si la détection des mutations de résistance aux antipaludiques peut aider à apprécier l'efficacité des médicaments antipaludiques.* » (Informateur-clé beta, Lubumbashi).

Sur la même lancée, les différents plans stratégiques nationaux (PSN) déployés par le PNLP au cours des dix dernières années confortent l'idée que le TET est la méthode de surveillance de prédilection pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques par le programme [23, 35]. Des documents normatifs du PNLP consultés, seul le PSN 2014 avait envisagé au passage, en plus des TET, des études des mutations de résistance pour surveiller spécialement la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) dans la perspective de l'utilisation de cette combinaison médicamenteuse pour le traitement préventif intermittent des épidémies saisonnières du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans [23]. Cependant, des évidences émanant de la confrontation des fouilles documentaires, des observations participatives et des entrevues, ont montré que la surveillance de la résistance aux antipaludiques ne faisait pas partie des activités réalisées au sein du PNLP au moment de la conduite de la présente enquête. En effet, il n'existait

pas une unité organisationnelle interne, officiellement chargée de telles activités. Ensuite, les rapports annuels des activités du PNLP consultés (Rapports PNLP 2013, 2016, 2018 et 2020) ne mentionnaient aucune activité en lien avec la surveillance des résistances aux antipaludiques [19, 33, 39]. Enfin, il s'avérait également qu'il n'existait aucun indicateur relatif à cette surveillance aussi bien dans la base des données épidémiologiques du PNLP que dans les documents des activités épidémiologiques antipaludiques existant au niveau des sites sentinelles. Un des interrogés s'était exprimé de la manière suivante :

« [Actuellement,] *Il n'existe pas une quelconque unité de surveillance des résistances organisée au sein du PNLP* [pour assurer la surveillance épidémiologique de la résistance aux antipaludiques]; *il y a plutôt une équipe qui travaille en connexion avec les chercheurs extérieurs de l'OMS sous un financement du CDC appelé étude PARMA* » (Informateur-clé sigma, Kinshasa).

Mais en tout état de cause, depuis 1998 (année de la création du PNLP), les fouilles documentaires ont permis de mettre à jours aussi bien des TET (n=18) que des études détectant les marqueurs moléculaires de la résistance (n=27), alors qu'aucun essai *in vitro/ex vivo* réalisé dans le pays n'avait été retrouvé (Tableau S8.2 ; Tableau S5.1). Ces évaluations avaient été conduites par des équipes diverses, indépendantes les unes des autres, avec ou sans la collaboration du PNLP. Elles avaient été réalisées sur des sites sentinelles du PNLP ou non. Lorsque le PNLP était impliqué à ces études, il semblait avoir plutôt un rôle auxiliaire. L'un des interrogés l'avait révélé en ces termes :

« *Des études* [entendues, les TET réalisés avec l'implication du PNLP] *sont proposées par les tiers et également sous la direction des tiers notamment l'OMS et/ou du CDC* » (Informateur-clé lambda, Kinshasa).

Le caractère limité et ponctuel des activités d'évaluation des résistances aux antipaludiques était perceptible sur le terrain et lors des fouilles documentaires. La plupart des études retrouvées lors des fouilles documentaires avait une allure discontinue, n'ayant pas été répétées ou poursuivies après un intervalle recommandé de deux ans maximum [1, 41, 88]. L'affirmation ci-après témoignait de façon éloquente l'irrégularité de ces études :

« De 2010 à ce jour seulement deux études [entendues, les TET réalisés avec l'implication du PNLP] ont été réalisés en 2012 et en 2017 couvrant 6 sites ; les efforts sont fournis pour qu'une étude soit implémentée en 2020 pour essayer de respecter le délai de 2 ans et 12 des 26 sites sentinelles sont déjà sélectionnés » (Informateur-clé lambda, Kinshasa).

La principale limite évoquée pour justifier l'absence d'activités régulières de surveillance des résistances aux antipaludiques au niveau du PNLP était l'absence de financement :

« Je pense que le PNLP dispose de ressources humaines [pour exécuter la surveillance des résistances aux antipaludiques] mais manque cruellement des ressources financières et matérielles pour le faire car il dépend totalement de l'appui extérieur » (Informateur-clé sigma, Kinshasa).

Tout compte fait, si la surveillance des résistances aux antipaludiques pouvait être perçue comme étant utile et justifiée, les mécanismes y afférents restaient presque inexistantes au sein du PNLP au moment de la réalisation de cette étude.

Faisabilité et analyse SWOT de la surveillance nationale des parasites porteurs des MMR

Les fouilles documentaires couplées aux observations participatives ont relevé que quatre enquêtes de surveillance ont été conduites de 2017 à 2020 sous le système de surveillance mis en place (**Tableau 8.2**). En tout, 3365 individus avaient été enrôlés (74,9% de patients reçus pour des soins et 25,1% de parturientes) dont 2095 (62,3%) ont pu être examinés avec succès pour des parasites du *P. falciparum* éventuellement porteurs de MMR. Ces enquêtes avaient porté sur la surveillance de la résistance à l'artémisinine (ART), la chloroquine (CQ), l'amodiaquine (AQ), la luméfántrine (L) et la sulfadoxine-pyriméthamine (S-P) en se basant sur l'analyse des gènes du *P. falciparum* codant pour les protéines *PfK13* (mutations du domaine propeller), *PfCRT* (mutation K76T et haplotype SVMNT), *PfMDR1* (nombre des copies du gène) et *PfDHFR/PfDHPS* (mutations *PfDHFR* N51I, C59R et S108N/*PfDHPS* A437G et K540E).

Au cours des entrevues, seul un groupe réduit issu du LBMFM/UNIKIN et de la direction du PNLP (6 sur 22) a pu approfondir les réflexions sur la faisabilité du système de surveillance fondé sur la détection des MMR. L'analyse thématique déductive des opinions des interrogés selon un schéma SWOT est présenté dans les **Tableaux 8.3**. Ainsi donc, le système mis en place était perçu comme ayant largement fonctionné avec à son profit de nombreux atouts et opportunités. En effet, l'organisation d'une unité fonctionnelle dévolue à la surveillance épidémiologique de la résistance, avec des objectifs, des compétences et un appui financier conséquent a été perçue au cours des entrevues comme étant un atout majeur du système nouvellement mis sur pied. Dès lors, l'option d'utiliser la détection des MMR à des fins de surveillance épidémiologiques avait été évoquée comme offrant une capacité d'analyses à haut-débit et dans un délai bref, une capacité d'anticiper l'émergence de la résistance avec la possibilité d'améliorer la couverture spatiale et de cartographier celle-ci tout en réalisant un monitoring à brefs intervalles de temps.

Tableau 8.2. Activités de surveillance des marqueurs moléculaires de la résistance observées entre 2017 et 2020

Activités de surveillance de la résistance	Performances atteintes
Enquête n°1	
Période de collecte des données	Janvier à Mars et Septembre à Décembre 2017
Population enrôlée	1070 patients symptomatiques avec TDR positif
Population analysée pour la résistance	764 patients avec une RT-PCR positive pour le <i>P. falciparum</i>
Laboratoire d'analyses	LBMFM/UNIKIN, CHU/ULiège
Nombre de sites de collecte	10 sites (Bolenge, Fungurume, Kalima, Kamina, Karawa, Katana, Kinshasa, Kisangani, Lubumbashi, Vanga)
MMR évalués	CQ (K76T de <i>PfCRT</i>), AQ (SVMNT de <i>PfCRT</i>), ART (Domaine de l'hélice de <i>PfK13</i>)
Enquête n°2	
Période de collecte des données	Novembre 2018 – Novembre 2019
Population enrôlée	364 patients symptomatiques en échec à l'ACT de 1 ^{ère} ligne
Population analysée pour la résistance	335 patients avec une RT-PCR positive pour le <i>P. falciparum</i>
Laboratoire d'analyses	LBMFM/UNIKIN, CHU/ULiège
Nombre de sites de collecte	6 sites (Bolenge, Fungurume, Katana, Kinshasa, Kisangani, Vanga)
MMR évalués	CQ (K76T de <i>PfCRT</i>), AQ (SVMNT de <i>PfCRT</i>), ART (Domaine de l'hélice de <i>PfK13</i>), L (Nombre de copies du <i>PfMDR1</i>)
Enquête n°3	
Période de collecte des données	Septembre 2019 – Janvier 2020
Population enrôlée	844 parturientes et leurs nouveau-nés
Population analysée pour la résistance	43 parturientes positives à la PCR
Laboratoire d'analyses	LBMFM/UNIKIN, CHU/ULiège
Nombre de sites de collecte	Un site (Kinshasa)
MMR évalués	S-P (<i>PfDHFR</i> N51I, C59R et S108N/ <i>PfDHPS</i> A437G et K540E)
Enquête n°4	
Période de collecte des données	Juillet – Novembre 2020
Population enrôlée	1087 patients symptomatiques avec TDR positif
Population analysée pour la résistance	906 patients avec une RT-PCR positive pour le <i>P. falciparum</i>
Laboratoire d'analyses	LBMFM/UNIKIN, CHU/ULiège
Nombre de sites de collecte	10 sites (Bolenge, Fungurume, Kalima, Kamina, Karawa, Katana, Kinshasa, Kisangani, Lubumbashi, Vanga)
MMR évalués	CQ (K76T de <i>PfCRT</i>), AQ (SVMNT de <i>PfCRT</i>), ART (Domaine de l'hélice de <i>PfK13</i>)

(*) TDR : test de diagnostic rapide du paludisme ; LBMFM/UNIKIN : Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa, CHU/ULiège : Centre Hospitalo-Universitaire de l'Université de Liège ; CQ : chloroquine ; K76T de *PfCRT* : la mutation K76T sur la protéine « *P. falciparum* chloroquine resistance transporter » ; AQ : amodiaquine ; SVMNT de *PfCRT* : l'haplotype SVMNT du 72^{ème} au 76^{ème} acide aminé de la protéine « *P. falciparum* chloroquine resistance transporter » ; ART : artémisinine ; *PfK13* : la protéine kelch 13 du *P. falciparum* ; *PfMDR1* : le gène de la protéine dite « *P. falciparum* multidrug resistance »

1 » ; *Pf*DHFR : la dihydrofolate réductase de *P. falciparum* ; *Pf*DHPS : la dihydroptéroate synthétase de *P. falciparum*.

Tableau 8.3. Analyse SWOT des facteurs affectant la faisabilité du système de surveillance épidémiologique des parasites porteurs des MMR en RDC*

Facteurs internes au système de surveillance		Facteurs externes au système de surveillance	
Forces	Faiblesses	Opportunités	Menaces
Organisation et capacités humaines			
- Objectifs clairement définis – recherche, enseignement, santé ;	- Effectifs du personnel permanent jugés insuffisants pour assurer les activités en routine ;	- Agents périphériques et intermédiaires du PNLP disposés à accompagner techniquement le système de surveillance ;	- Formalités traînantes pour l’implémentation des activités du LBMFM/UNIKIN dans la politique nationale ;
- Existence d’une entité organisée, spécifiquement établie au sein de l’organisation pour assurer les activités ;			
- Capacités internes disponibles pour l’assurance qualité et la gestion des données ;			
- Multidisciplinarité des compétences mises au service des activités (par ex. parasitologie, microbiologie, biologie moléculaire, épidémiologie, pharmacologie) ;	- Compétences insuffisantes en bio-informatique et technologies de séquençage de nouvelle génération ;		
Leadership, gestion, partenariat et gouvernance			
- Existence d’un Comité fonctionnel de Pilotage du programme ;	- Compétition entre partage des données avec les organisations extérieures et publications scientifiques	- Soutien politique de la direction et des responsables des sites sentinelles du PNLP ;	- Changements fréquents des responsables au niveau gouvernemental et politique du PNLP ;
- Appuis financiers reçus pour les	- Forte dépendance du	- Possibilité de diversifier les sources de financement ;	- Absence d’appui financier à long terme et

activités du LBMFM/UNIKIN (2012-2016 et 2017-2021) ;	système vis-à-vis des donations étrangères ;	d'origine nationale pour pérenniser les activités ;
- L'offre de la formation de niveau universitaire et technique ;	- Rotation rapide de certains intervenants du LBMFM/UNIKIN (particulièrement les doctorants) et leur gestion à moyen terme non maîtrisée ;	- Absence d'appui financier d'origine nationale pour soutenir les activités de formation ; - Gestion non maîtrisée des agents périphériques du PNLP collaborant aux activités de surveillance ;
- Existence d'accords de collaborations et de partenariats signés avec diverses organisations nationales, régionales et internationales ;	- Possibilité d'étendre et de diversifier les partenariats	
Travail et suivi des activités		
- Existence d'un plan chiffré de travail et de suivi des activités ;	- Salaires insuffisants pour les différents intervenants au sein du programme ; - Déficit d'un poste technique pour le suivi & l'évaluation interne des activités et des compétences ;	- Scepticisme affiché par certains intervenants sur l'utilité de la surveillance épidémiologique à base des MMR ;
- Couverture des activités étendue à dix sites sentinelles présélectionnés ;	- Les données disponibles proviennent essentiellement de sujets symptomatiques avec TDR positif, avec une insuffisance d'informations sur les populations asymptomatiques alors qu'ils sont un réservoir potentiel des parasites ;	- Accessibilité aux patients et facilité à atteindre la taille de l'échantillon visé ; - Expansibilité géographique et populationnelle du système (ex. nouveaux sites de collecte, nouvelles catégories de la population à cibler, etc.)
- Procédures de laboratoire bien établies et validées depuis 2013 ; - Mise au point de nouvelles techniques de biologie moléculaire pour	- Absence d'inclusion des parasites infestant le vecteur ainsi que des espèces autres que <i>P. falciparum</i> ; - Problèmes d'approvisionnement en matériel de collecte des	- Existence locale de chaîne d'approvisionnement en réactifs et matériels pour la collecte des échantillons et les analyses - Manque d'audit externe des analyses biologiques ;

détecter les résistances ;	données sur certains sites (ex. ruptures en TDR) - Dépendance à une sous-traitance extérieure pour certaines analyses indisponibles localement (ex. séquençage) et entretien d'équipement ;	moléculaires ;	
- Extension des activités au niveau national depuis 2017 ;	- Analyses moléculaires incomplètes au cours de certaines enquêtes (ex. pas d'informations sur la résistance à la quinine ou à luméfántrine, deux antipaludiques importants localement)		- Connectivité et accessibilité difficile de certains sites (insécurité et inaccessibilité géographique) ;
- Protocoles d'enquêtes et des analyses élaborés et mis à jour ;			
- Complétude de la collecte des données ;			
- Etablissement des bases de données nationales et sous régionales ;			
- Promptitude dans les analyses moléculaires et statistiques ;			
Évaluation, recherche, supervision & utilisation des données			
- Utilisation et analyse non limitées aux variables concernant la résistance (par exemple, le coût des soins, la qualité de vie des patients, etc.) ;	- Audit interne limité des données sur les résistances aux antipaludiques ; - Absence de rétrodiffusion des résultats au PNLP et à la population ;	- Reconnaissance de la problématique de la résistance aux antipaludiques en réservant tout un nouveau volet d'activités à sa surveillance par le Plan Stratégique National de la santé ;	
- Formation doctorale assurée en parallèle des activités ;			
- Supervision en interne des activités de terrain ;	- Les procédures garantissant l'évaluation interne de la qualité de services demeurent à mettre en place selon les normes ISO ;	- Possibilité d'établir un partenariat d'appui spécifique à l'assurance qualité externe des activités du	- Défaut d'évaluation externe des activités du LBMFM/UNIKIN ; - Indisponibilité des autorités du PNLP pour les réunions

	LBMFM/UNIKIN ;	d'échange sur les activités et la planification conjointe pour l'utilisation et la valorisation des informations issues du système de surveillance de la résistance ; - Prise en compte insuffisante/limitée des résultats dans la politique antipaludique nationale ;
- Avantages liés à la méthode moléculaire par rapport aux autres méthodes de surveillance de la résistance : capacité haut-débit, dans un temps bref coût bas de fonctionnement, capacité d'anticiper l'émergence de la résistance, possibilité de cartographier la résistance	- Faible corrélation entre les données moléculaires et les données cliniques conduisant à un manque de retombées immédiatement perceptibles pour les patients et les cliniciens ;	- Possibilité limitée d'interpréter les résultats en lien avec les TET par insuffisance de connectivité entre différents partenaires intervenant dans la surveillance ;
(*) MMR : Marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques ; ISO : Organisation internationale de normalisation ; PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme ; LBMFM/UNIKIN : Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa		

De l'avis des intervenants, ces forces en faveur du nouveau programme de surveillance pourraient être potentialisées en s'appuyant davantage sur de nombreuses situations contextuelles favorables qui existaient. Ces dernières incluaient l'appui politique des autorités du PNLP, la possibilité d'étendre et diversifier les partenariats, l'expansibilité géographique des activités et les facilités qu'offrent la disponibilité des patients et des agents formés pour la collecte des données sur différents sites sentinelles. Ces facteurs constitueraient donc autant d'opportunités pour la consolidation et le développement futur du programme de surveillance épidémiologique mis sur pied.

A l'opposé, les interrogés ont relevé à plusieurs reprises des facteurs négatifs relevant soit de l'organisation et du fonctionnement du système mis en œuvre (les faiblesses), soit de l'impact des facteurs exogènes, environnementaux et contextuels qui menaceraient cette mise en œuvre (les menaces) (**Tableau 8.3**). Il s'agissait essentiellement de barrières d'ordre financier ou de tout autre ordre mais dont la solution passerait par un financement conséquent (ex. accroissement du personnel impliqué, renouvellement des compétences, acquisition des équipements manquants, extension des sites et types de populations couverts). Par ailleurs, le manque de rétrodiffusion des résultats aux sites sentinelles, le scepticisme sur l'utilité des méthodes moléculaires pour l'évaluation de la pharmaco-résistance et la prise en compte jugée insuffisante des analyses des résistances dans les stratégies antipaludiques en vigueur, ont également été relevés comme faiblesses et menaces existantes pour le système de surveillance mis sur pied.

8.5. Discussion

Cette étude a montré que la surveillance des résistances aux antipaludiques était largement perçue, au cours des entrevues, comme étant nécessaire et justifiée en RDC. Cependant, des mécanismes de surveillances étaient encore presque inexistantes parmi les stratégies en vigueur au sein de la politique nationale de lutte antipaludique définie par le PNLP. A la place d'une surveillance épidémiologique, des évaluations ponctuelles du paludisme pharmaco-résistant avaient été réalisées en RDC. Toute ces évaluations restaient l'apanage d'organisations très diverses avec ou sans liens avec le PNLP. De telles évaluations sont d'une utilité restreinte et ne sauraient couvrir les besoins stratégiques d'une surveillance épidémiologique continue, du fait de leur caractère ponctuel, leur hétérogénéité méthodologique et l'imprévisibilité de leur organisation future. La nécessité urgente de mettre sur pied un système de surveillance pérenne de la résistance aux antipaludiques restait donc d'actualité en RDC. Ainsi donc, un

système fondé sur la détection des parasites porteurs des MMR avait dû être mis sur pied grâce à un projet impliquant plusieurs institutions partenaires, le PNLP inclus [205, 215, 311]. Ce programme de surveillance avait une architecture centralisée autour du LBMFM/UNIKIN, une unité chargée d'assurer, outre les analyses de laboratoire et la gestion des données, l'organisation et la planification des enquêtes de terrain en collaboration avec le PNLP. Pour ce faire, le système créé était doté d'une équipe réduite, flexible, capable de se déployer facilement sur le terrain pour d'éventuelles supervisions directes des activités réalisées par les agents périphériques pour collecter les échantillons biologiques et les données épidémiologiques. Comparé à un possible système décentralisé, l'architecture centralisée du système du LBMFM/UNIKIN était en faveur d'un rapport coût/efficacité avantageux pour une conduite des activités de surveillance durant la périodicité souhaitée (ex. environ tous les deux ans, selon l'OMS [41, 88]).

Les interrogés s'étaient accordés que le système créé au sein du LBMFM/UNIKIN était fonctionnel. Plusieurs atouts et opportunités offrant à ce système de surveillance des avantages en tant qu'outil épidémiologique ont été mis en exergue au cours des entretiens. Il s'agissait, entre autres, de la capacité d'effectuer des analyses massives à un coût relativement bas et dans un délai bref. En effet, d'après l'OMS, il faudrait prévoir un minimum d'environ 50 000 à 60 000 US\$ par an pour un seul TET standard [41]. Des études ultérieures sont nécessaires pour comparer le coût de la surveillance de la pharmaco-résistance par différentes méthodes. Mais avec la démocratisation croissante des méthodes moléculaires, il semble possible d'atteindre un rapport coût-efficacité encore plus avantageux en mettant à contribution, pour la détection des marqueurs moléculaires de la résistance, les technologies récentes de séquençage à haut débit, en temps-réel et à faible coût [312-314]. Par-dessus tout, les méthodes moléculaires présentent l'avantage de ne pas être affectées par les facteurs confondants des résultats des TET comme l'immunité de l'hôte et la pharmacocinétique des médicaments [11]. Ces méthodes rendent possible l'évaluation de la résistance aux molécules antipaludiques individuelles tout en

offrant la possibilité d'explorer plusieurs molécules à la fois, y compris celles non encore utilisées dans une région ou déjà retirées de l'usage clinique mais devant rester sous surveillance comme la chloroquine [11]. En plus, les méthodes moléculaires peuvent potentiellement anticiper la résistance avant qu'elle ne devienne perceptible cliniquement, offrant ainsi une fenêtre utile pour la mise en place des mesures de santé publique [14, 75]. Ce dernier atout s'avère crucial actuellement, face à la perspective de l'émergence de la résistance à l'artémisinine (ART) et ses dérivés en Afrique [14, 75]. A l'opposé, les TET sont connus comme ayant un seuil de détection plus élevé, ne révélant souvent la résistance aux antipaludiques que lorsqu'elle est déjà suffisamment développée dans la population pour ne laisser que des marges réduites pour la mise en place des mesures épidémiologiques [11]. Bien plus, la collecte et la conservation des échantillons destinés aux analyses des MMR sont faciles à réaliser, y compris en milieu rural, ne nécessitant qu'une brève formation du personnel affecté à cette tâche [11]. Les protocoles d'enquête de nature transversale utilisés à cette fin permettent de réduire au maximum les cas perdus de vue et diminuent sensiblement la durée des investigations sur le terrain. Au-delà de ces avantages, la grande sensibilité des méthodes moléculaires rend possible leur application même sur des catégories de la population habituellement exclues des TET pour des raisons éthiques ou techniques mais ayant un potentiel épidémiologique considérable dans l'émergence et la diffusion des parasites résistants aux antipaludiques (par exemple, les porteurs asymptomatiques ayant des parasitémies palustres faibles, les femmes enceintes, etc.) [11, 41]. Tous ces avantages positionnent les MMR comme étant un outil adapté à des fins de surveillance épidémiologique [11, 14, 205]. Néanmoins, la politique stratégique élaborée par le PNLP à la suite des directives de l'OMS érige encore les TET en étalon d'or pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques [1, 23, 35, 88]. Et c'est de façon non surprenante, aux décours des entrevues, les TET émergeaient encore comme étant la méthode privilégiée pour une éventuelle surveillance de la résistance aux antipaludiques en RDC. Mais en

dépité de leur habilité à guider les décisions thérapeutiques, les TET s'avèrent difficiles à implémenter de façon continue et efficace pour la surveillance épidémiologique à large échelle de la résistance dans les pays endémiques et à ressources limitées comme la RDC. Outre le coût élevé nécessaire à leur mise en œuvre, les TET peuvent être entamés dans leur utilité pratique par l'interférence de plusieurs facteurs comme les recrudescences, les réinfections ou l'immunité acquise qui coexistent dans ces pays [1, 11, 88]. Le système nouvellement mis en place en RDC pourrait donc, à juste titre, compter sur les avantages des méthodes moléculaires. Ce système aura permis non seulement d'établir des procédures de laboratoires mais également de construire des bases des données pour la cartographie des résistances aux antipaludiques sur l'étendue du pays, qui sont des outils essentiels pour l'établissement d'une surveillance épidémiologique continue de la résistance aux antipaludiques (<https://osf.io/vhy5p/>; <https://pfk13africa.cbira.be/>). Au-delà de tous ces avantages, de nombreuses situations contextuelles avaient été épinglées dans les entrevues comme étant des opportunités à l'actif du programme mis sur pied. Il s'agissait notamment de l'appui politique dont l'organisation dudit système bénéficiait de la part des autorités du PNLP, de la possibilité d'étendre et diversifier les partenariats, de l'expansibilité géographique et populationnelle des activités ainsi que des facilités qu'offrent la disponibilité des patients et des agents formés pour la collecte des données sur différents sites. Ces facteurs peuvent donc être mis à profit pour consolider et développer davantage le système déployé pour surveiller les MMR en RDC.

Toutefois, plusieurs menaces et faiblesses devant attirer l'attention des décideurs ont été relevées au cours de l'étude, nécessitant une réponse adéquate afin de garantir la durabilité des activités du programme mis en place. Il s'agissait essentiellement de barrières d'ordre financier. En effet, l'appui financier du Gouvernement Belge, reçu pour ce programme à travers l'ARES (2013-2016 et 2017-2021), touchant à sa fin, laisse entrevoir des difficultés possibles pour la mise en œuvre future. Par ailleurs, de nombreuses faiblesses relevées dans le

fonctionnement du système mis en place exigent des solutions passant par un financement conséquent. C'est notamment le cas de la nécessité d'accroître le personnel impliqué, de renouveler les compétences, d'acquérir des équipements manquants, d'entretenir les équipements existants, d'étendre les sites de collecte des échantillons et de multiplier les types de populations investigués. Il est peu probable qu'un financement à court terme de ces activités provienne du Gouvernement Congolais qui fait encore face à d'autres défis compétitifs majeurs ne lui permettant de contribuer encore qu'à hauteur de 11% aux dépenses de santé dans le pays [121]. Ce faisant, l'accès universel aux services de prévention, de diagnostic et de traitement du paludisme dans différents établissements de santé, prévu par le Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme (PSN) 2016-2020, n'a lui-même pas pu être concrétisé en totalité [35, 40]. Dans ce contexte, il reviendra aux responsables du programme mis sur pied et leurs partenaires, d'innover pour trouver des sources nécessaires pour le financement à plus ou moins long terme afin d'assurer la pérennité des activités et la poursuite de leurs objectifs, en résolvant les faiblesses et les dangers ayant été révélés par la présente étude. La rentabilisation des outils moléculaires développés pourrait constituer une source alternative de financement. Outre les problèmes de financement, l'absence de rétrodiffusion des résultats aux sites sentinelles, le scepticisme persistant sur l'utilité des MMR et la prise en compte insuffisante des données moléculaires dans les stratégies antipaludiques, sont également des défis nécessitant d'être relevés. Pour ce faire, des approches communicationnelles plus adaptées, par exemple la tenue de réunion ad hoc ou la transmission régulière de rapports épidémiologiques, s'avèrent nécessaires pour appuyer le fonctionnement du programme.

Au-delà de tous ces défis, il y a les limites inhérentes à l'approche moléculaire qui devraient toujours être prises en compte dans la mise en œuvre du système créé et dans l'interprétation de ses résultats. En effet, en dépit des avantages discutés plus haut, les MMR aux antipaludiques ne sont pas toujours corrélés aux résultats cliniques *in vivo* [11]. Ceci limite leur utilité en pratique clinique de routine et

contribue probablement au scepticisme parfois affiché par certains prestataires face à ces méthodes. Il n'en va pas moins que ces marqueurs demeurent très utiles en santé publique notamment lorsque leur interprétation est réalisée à l'échelle des populations. Ces méthodes moléculaires offrent ainsi un champ très vaste d'applications en santé publique incluant la mesure de la prévalence de la résistance, l'évaluation de l'efficacité de la politique thérapeutique en place, la cartographie de la résistance, ainsi que l'investigation de l'origine et l'évolution du paludisme pharmaco-résistant [11, 14, 61, 75, 234]. Mais l'analyse des MMR exige généralement un niveau conséquent de technicité et d'expertise pouvant limiter leur utilisation [7]. Des programmes de formation appropriés à l'intention des intervenants devraient être considérés pour pallier à ces exigences. Et finalement, même si d'importants progrès ont été réalisés ces dernières années en termes d'identification de MMR aux différents antipaludiques, il persiste encore des molécules, comme la Primaquine ou la quinine, pour lesquelles aucun marqueur n'a pu être encore définitivement validé [7]. De même, dans certaines populations, il est possible que d'autres facteurs génétiques encore méconnus soient à l'origine d'une résistance médicamenteuse en absence de MMR reconnus [85, 122]. Les souches parasitaires circulant en Afrique ont été soupçonnées comme pouvant recourir à des voies génétiques propres, en dehors de classiques mutations du gène codant pour le *PfK13*, pour développer la résistance à l'ART [86]. L'utilisation des méthodes moléculaires à des fins de surveillance épidémiologique de la résistance peut être donc limitée dans ces cas. Des recherches fondamentales devraient être poursuivies pour identifier davantage des marqueurs de résistance pertinents pour des objectifs de surveillance épidémiologique. Dans tous les cas, un système idéal pour la surveillance épidémiologique de la résistance est celui qui pourrait combiner différentes méthodes (par exemple, TET, essais *in vitro/ex vivo* et marqueurs moléculaires de résistance) pour pouvoir bénéficier des avantages de chacune d'elles dans la poursuite de l'objectif de santé.

Cette étude a comporté de nombreuses limites. En effet, au cours des entrevues, seul un groupe réduit d'intervenants avait été en mesure d'élaborer en profondeur des réponses aux questions sur le système de surveillance mis sur pied. Le reste d'intervenants, notamment ceux prestant en périphérie sur les sites de collecte, s'estimait ne pas être suffisamment informés sur ledit système. Il n'a pas également été possible d'organiser le focus group comme prévu initialement par la boîte à outils du MECAT, à cause notamment de la situation liée à la pandémie de la COVID-19. De nombreuses thématiques tout aussi intéressantes à étudier, comme par exemple l'évaluation du niveau de compétence technique des intervenants ou l'estimation du coût des activités, n'ont pu être explorées dans cette étude et pourrait faire l'objet d'études futures.

8.6. Conclusion

En dépit de ces limites, cette étude a montré que des mécanismes pour la surveillance régulière de la résistance aux antipaludiques restaient déficitaires au sein de la politique sanitaire en vigueur en RDC. Ainsi, le système nouvellement mis en place pour surveiller les parasites pharmaco-résistants s'avérait salubre. Fondé sur la détection des MMR grâce à une approche organisationnelle centralisées, ce système offrait une stratégie opérationnelle et avant-gardiste issues de domaines alternatifs aux TET standards et pouvant aider à renforcer substantiellement les mesure de contrôle du paludisme pharmaco-résistant dans la population congolaise. A l'opposé, des défis émanant soit du mode d'organisation fonctionnelle dudit système ou soit de l'impact des facteurs exogènes, environnementaux et contextuels, ont été également identifiés comme menaces et des faiblesses pour sa mise en œuvre et devrait servir de leviers pour consolider et pérenniser le système.

Contribution des auteurs

NS, ARA et NKK ont conçu l'étude. NKK a rédigé le protocole de l'étude. NKK, DMY, ARA et NS ont conduit les entrevues, les fouilles documentaires et les observations participatives. NKK, DMY et NS ont analysé les données. NKK, ARA, PLD et NS ont rédigé le manuscrit initial. NKK, DMY, BD, DMM, PZK, JLL, LK, PDM, GLM, PLD, PB, MPH, ARA, PLD et NS ont apporté une contribution majeure à la révision du protocole d'étude et au manuscrit.

Remerciements

Nous remercions la direction nationale du PNLP ainsi que les membres du personnel des différentes zones de santé et des établissements de santé des différents sites sentinelles du PNLP pour leur participation active et leur soutien lors de la conduite de l'étude sur le terrain.

CHAPITRE 9. DISCUSSION GENERALE

Cette thèse s'était assigné l'objectif initial de faire un état des lieux du paludisme pharmaco-résistant sur l'étendue de la RDC en étendant la discussion à l'échelle sous régionale de l'Afrique. Cet objectif a été poursuivi à travers deux revues systématiques (**Chapitre 4** et **Chapitre 5**) et une étude originale (**Chapitre 6**). Les résultats obtenus montrent que le paludisme pharmaco-résistant constitue un problème de santé publique en RDC, dont les implications épidémiologiques dépendent du médicament concerné et peuvent varier nettement en fonction de l'évolution dans le temps, de la distribution géographique et de la population cible. D'où la nécessité d'une contextualisation dans la mise en œuvre des mesures de santé publique pour prévenir, contrôler ou réduire cette pharmaco-résistance du paludisme à travers le pays. En effet, des évidences recueillies ont montré que la *PfART-R* a émergé et tend à diffuser en Afrique, notamment dans la sous-région des Grands-Lacs qui inclue la partie Est de la RDC [14, 78, 83]. Bien que cette résistance ne soit pas encore établie dans le pays, le risque imminent d'une émergence locale ou d'une diffusion à partir des foyers de résistances retrouvés dans les pays voisins (ex. Rwanda, Ouganda) est bien réel [14, 78, 83]. Dès lors que cette situation suscite de sérieuses inquiétudes pour l'avenir proche de l'ART et ses dérivés sur le continent entier, des mesures proactives dont notamment une intensification de la surveillance épidémiologique s'avèrent urgemment nécessaires dans la population congolaise et dans la sous-région [14]. Cette surveillance devrait être optimisée en incluant toutes les catégories de mutations dont la pertinence biologique pour la *PfART-R* est actuellement démontrée ou suspectée. Il s'agit notamment des mutations reconnues par l'OMS comme MMR et situées sur le domaine de l'hélice du gène de *PfK13* [1], des mutations du *PfK13* mimant celles liées à la résistance [14], ainsi que des mutations situées ailleurs sur ce gène notamment dans le domaine BTB/POZ ou même sur d'autres gènes du

P. falciparum comme celui de la *Pf*Coronine [128, 228, 233]. En RDC, spécialement, les provinces de l'Est du pays devraient être ciblées par des mesures renforcées pour contrer l'émergence et la diffusion de cette résistance à l'ART. En plus du traçage des cas, du dépistage des migrants et de la surveillance aux frontières, des efforts supplémentaires seront nécessaires pour réduire la pression sélective dans ces zones à risque. C'est le cas des campagnes visant à limiter toute forme de traitement en monothérapie et la consommation de l'*Artemisia annua* ou *afra* en poudre ou en tisane – des pratiques populaires susceptibles de précipiter l'émergence ou d'accélérer la diffusion des parasites résistants à l'ART. La résistance à la CQ, pour sa part, semble en voie de diminution mais reste >30% voire même sensiblement plus élevée sur certains sites qui atteignent 80% de prévalence. Cette résistance devra être surveillée régulièrement sur différents sites dans l'espoir d'un retour à la sensibilité totale des parasites circulant à travers le pays. En attendant, la perspective d'une possible réintroduction à court terme de ce médicament dans la pratique clinique antipaludique en RDC reste incertaine [205]. Ceci est d'autant plus vrai que l'émergence récente de la pandémie de la maladie à coronavirus 2019 (COVID19) avec l'infodémie associée et les mesures collectives adoptées, ont potentialisé davantage le risque pour le développement du paludisme pharmaco-résistant du fait de l'utilisation incontrôlée des dérivés de la CQ et de l'ART supposés avoir des vertus préventives ou curatives contre le nouveau virus [206]. Des mesures urgentes doivent être mises sur pied pour encadrer cette utilisation des médicaments antipaludiques. Quant à la résistance à la S-P, elle s'est révélée être très fréquente mais de profil modéré (*Pf*DHPS A437G dans 97,7% et *Pf*DHPS K540E dans 45,2% d'isolats analysés) et sans une tendance notable à diminuer avec le temps en dépit du retrait de cette combinaison médicamenteuse du traitement curatif et de sa restriction en traitement préventif depuis plus de quinze ans. Cette résistance à la S-P tend à être plus élevée dans la partie Est de la RDC qu'ailleurs dans le pays et a des implications épidémiologiques dépendant clairement de la population potentiellement visée par le traitement préventif. Dans

la population des femmes enceintes, où la résistance semble plus élevée que dans le reste de la population, la S-P a perdu son efficacité escomptée lorsqu'elle est utilisée pour le TPIg du paludisme. Il en résulte logiquement un risque accru de transmission congénitale ou communautaire des parasites et, probablement, de développement accru de leur résistance aux médicaments antipaludiques. Malgré tout, la S-P reste indiquée pour le TPIg en RDC comme dans d'autres pays endémiques d'Afrique (y compris en contextes de résistance de niveau élevé), en raison de la préservation d'une certaine efficacité clinique attribuable à ses effets dits non-paludiques (ex. effets antibiotiques et immunomodulateurs) sur des issues défavorables de la grossesse comme le faible poids de naissance [207, 234, 247]. Par contre, dans la population des enfants, l'utilité de la S-P en guise de TPIe, faute d'évidences suffisantes, reste incertaine en situation de résistance aussi répandue qu'en RDC même si un seuil *Pf*DHPS K540E de <50% reste défini par l'OMS pour indiquer son utilisation [243]. Ainsi donc, alors que le PNLP a envisagé l'introduction du TPIe-SP dans la politique nationale [23], des études préalables paraissent nécessaires pour évaluer l'efficacité de ce traitement et guider les autorités sanitaires dans la prise des décisions. En parallèles, des traitements alternatifs à la S-P, tels qu'une combinaison de la S-P avec un dérivé d'ART, devraient également être envisagés et évalués. Par ailleurs, la résistance à la MQ n'a pas été observée sur les différents sites explorés. Il est possible que ce médicament ait pu être épargné de la résistance par son temps de demi-vie long ou son plus faible utilisation antérieure en monothérapie dans la région, par rapport aux autres antipaludiques. Par contre, la résistance à d'autres médicaments comme la QN, la L et la PIP ne saurait être exclue avec assurance car ayant été faiblement explorée ou par défaut des marqueurs validés définitivement pour cette évaluation. La résistance à l'AQ, classiquement liée à l'haplotype SVMNT du *Pf*CRT (ou allèle 7G8), n'a pas été confirmée mais pourrait néanmoins être soupçonnée d'émergence en raison de la mutation *Pf*MDR1 N86Y retrouvée fréquemment dans les enquêtes l'ayant recherchée. Des recherches fondamentales devront être

poursuivies afin d'établir des MMR validés et d'étendre la surveillance de la résistance à ces médicaments sur le territoire national, afin de résoudre ces soupçons. En attendant, les efforts de surveillance en cours ne pourront se baser que sur les marqueurs moléculaires existants et non validés qui permettent, tout au plus, d'évoquer une suspicion de la résistance. Néanmoins, vis-à-vis de tout antipaludique, la surveillance régulière et à large échelle des parasites résistants ou suspects de résistance demeure cruciale pour informer les décideurs sanitaires, guider la prise des décisions de santé publique et orienter la politique sanitaire nationale. Mais au-delà de cette surveillance épidémiologique, le contrôle de la pharmaco-résistance dans un pays endémique comme la RDC nécessitera tout un faisceau d'autres mesures de santé publique plus générales, destinées à contrôler le paludisme, à améliorer les conditions de vie sociale de la population et à minimiser l'impact en santé publique des parasites résistants. En plus du traitement avec des médicaments plus efficaces et des mesures vectorielles, l'arrivée d'un vaccin efficace contre le *P. falciparum* pourrait venir jouer un rôle important [315]. Des avancées substantielles ont été effectivement observées avec le développement des vaccins antipaludiques dont le plus avancé a reçu l'approbation de l'OMS pour la mise à échelle en Afrique, après avoir achevé une efficacité modérée en phase III d'un essai clinique [316, 317]. Il devient concevable que, dans un avenir proche, l'utilisation massive d'un vaccin efficace contribue à réduire la transmission du paludisme et, ce faisant, à contrer la diffusion des parasites pharmaco-résistants [315]. Cependant, seul le temps déterminera combien de ces produits atteindront effectivement ces objectifs dans les populations les plus touchées par le paludisme dans le monde.

Dans la suite, pour discuter du contexte beaucoup plus général dans lequel évolue éventuellement le paludisme pharmaco-résistant en RDC, cette thèse s'était assigné l'objectif d'analyser les aspects socio-économiques du recours aux soins antipaludiques et de la mise en œuvre des stratégies antipaludiques en vigueur (**Chapitre 7**). En effet, la lutte contre le développement du paludisme pharmaco-

résistant est censé aborder le problème dans sa complexité en couvrant, outre les facteurs biologiques tels que les MMR des parasites discutés plus haut, des facteurs étiologique de nature programmatique tels que les stratégies antipaludiques adoptés et les comportements humains affichés vis-à-vis de ces stratégies [8, 9]. Ces analyses avaient ainsi porté sur le paludisme non compliqué, la forme clinique représentant éventuellement le fardeau le plus élevé de la maladie en raison de sa forte incidence et de la survenue, au fil du temps, de multiples épisodes intermittents chez les mêmes personnes [280, 281, 318]. Les résultats obtenus attestent qu'en dépit de l'accès gratuit au diagnostic et traitement antipaludique préconisé par le PNLP, la population congolaise encoure encore des coûts élevés des soins et un fardeau social considérable (absentéisme, perte de temps, poids de désutilité) en cas de paludisme non compliqué. La réflexion menée a épinglé plusieurs facteurs intimement liés aux coûts élevés des soins et à l'altération de la qualité de vie des patients impaludés qui pourraient, à priori, servir également de lit au développement du paludisme pharmaco-résistant. Il s'agit entre autres, des pertes importantes de temps en dehors du circuit hospitalier, l'absence d'une couverture des soins par une assurance maladie et les disparités socio-sanitaires aux détriments des résidents des zones rurales. Ces facteurs favorisaient, en effet, le recours fréquent au secteur informel (automédication, soins traditionnels, etc.) pour des soins antipaludiques de première intention dont la qualité est incertaine. Le paludisme pharmaco-résistant qui pourrait en résulter est, à son tour, susceptible d'augmenter davantage les coûts des soins et le fardeau de la maladie en entraînant éventuellement des échecs thérapeutiques, des formes cliniques plus sévères de la maladie, une pérennisation de la transmission communautaire, et une pression plus importante sur un système de santé déjà fragile [8, 9, 299, 300]. Au-delà de la nécessité d'une surveillance épidémiologique démontrée plus haut, ces derniers résultats soulignent toute l'importance des mesures antipaludiques de nature sociales et économiques pour contrer le développement du paludisme pharmaco-résistant en RDC. A titre illustratif, le subventionnement total de la prise en charge

des cas de paludisme non compliqués par le biais de mécanismes d'assurance maladie pourrait aider à réduire considérablement les dépenses personnelles des soins, le temps perdu au stade pré-hospitalier et les disparités sociales dans la population, tout en prévenant potentiellement la pharmaco-résistance par un accès accru à une meilleure qualité de soins. Pour ce faire, des plaidoyers renforcés pour un subventionnement plus important de l'accès au traitement antipaludique de qualité, par les organisations gouvernementales et non gouvernementales, sont nécessaires.

Pour finir, cette thèse a exploré qualitativement les approches déployées pour surveiller en routine la résistance aux antipaludiques en RDC et a évalué la faisabilité de l'implémentation, au sein des stratégies en vigueur, d'un système de surveillance fondé sur la détection des MMR (**Chapitre 8**). Il est apparu ainsi que les mécanismes de surveillances épidémiologiques de la résistance aux antipaludiques étaient quasi-inexistants faute principalement de financements conséquents au niveau du PNLP. Les évaluations disponibles, certes utiles, étaient ainsi plus des enquêtes ponctuelles que des véritables processus de monitoring dans le temps. Cette surveillance épidémiologique était essentiellement pressentie par différents prestataires comme devant se reposer sur le TET, l'approche classiquement préconisée par l'OMS et, à sa suite, le PNLP. Par contre, le système de surveillance proposé, fondé sur la détection des MMR, s'est révélé comme étant une solution alternative et faisable en pratique. Au cours de l'enquête menée, en effet, les avantages évoqués au compte du monitoring des MMR incluaient la possibilité de mener des activités de surveillance massive, dans un délai relativement court, couvrant aussi bien l'évaluation des antipaludiques en cours d'usage que ceux déjà retirés de la pratique clinique. Cette faisabilité pratique fait de la détection des MMR une méthode de choix pour la surveillance de routine censée être rapide, extensive et régulière. De plus, les approches moléculaires peuvent être appliquées aussi sur des catégories de la population, comme les sujets asymptomatiques ou les femmes enceintes, ayant généralement de faibles niveaux

de parasitémie périphérique rendant techniquement difficile l'application des autres approches (c'est-à-dire, les TET et les essais *in vitro/ ex vivo*) [11]. Cette capacité offre à la détection des MMR un potentiel épidémiologique considérable étant donné que, en milieu endémique, les sujets atteints de paludisme asymptomatique constituent la grande majorité des cas et le réservoir principal pour la transmission des parasites du paludisme y compris probablement les parasites pharmaco-résistants [319]. La surveillance des MMR a ainsi le potentiel de réduire considérablement la morbi-mortalité et alléger le fardeau socio-économique liés au paludisme non compliqué. Malgré tout, la mise en œuvre au long court de la surveillance des MMR restait également menacée par un financement limité. En conséquence, dans ce contexte à ressources limitées, des études ultérieures sont indiquées pour évaluer le rapport coût-bénéfice de ce nouvel outil de surveillance afin de renseigner les décideurs politico-sanitaires de son gain social potentiel et de sa rentabilité. Ces études devront éventuellement être complétées par des évaluations du rapport coût-efficacité de l'implémentation en routine dudit système afin d'en apprécier l'efficience et l'utilité en comparaison à l'approche TET actuellement recommandée. Pour ce faire, il sera indispensable de mesurer les indicateurs potentiels d'impact des différentes approches (ex. réduction de la morbi-mortalité, accroissement de l'efficacité thérapeutique, l'allègement du fardeau socio-économique de la maladie) et d'estimer les coûts (directs, indirects et intangibles) de leur mise en œuvre selon différentes perspectives (individuelle, nationale, sous régionale ou internationale) [286, 320]. D'autres obstacles identifiés à l'encontre de la surveillance moléculaire du paludisme pharmaco-résistant étaient une dépendance extérieure et une faible prise en compte des résultats dans les décisions stratégiques de la politique antipaludique nationale. Ceci est dû probablement à la limite à l'utilisation des MMR qui existe au niveau individuel du fait que, sur le plan de la signification biologique, ces marqueurs sont plus le reflet de la pression médicamenteuse assurée sur les parasites qui, souvent, précède le développement ou l'expansion de la résistance clinique. Les MMR

correspondraient donc à un agrégat du risque épidémiologique de résistance clinique dans la population sans corrélation nécessaire avec une réponse phénotypique individuelle (ex. cas d'échec clinique ou de retard de clairance parasitaire) [11]. Cette limite apparente peut toutefois donner lieu à des applications épidémiologiques intéressantes dont notamment la possibilité d'anticiper l'apparition clinique de la pharmaco-résistance, en plus de la possibilité à cartographier le développement de la résistance et à en évaluer l'extension ou la variabilité géographique. En détectant la résistance au stade préclinique, les MMR offrent une période-fenêtre suffisante pour la mise en place de mesures de santé publique contre la pharmaco-résistance. Ceci appelle une collaboration entre la communauté des chercheurs et celle des praticiens pour intégrer la portée de cette nouvelle stratégie dans la pratique afin de coaliser les efforts vers l'élimination de ce fléau.

Somme toute, le système de surveillance nouvellement créé apparaît donc comme un outil épidémiologique avant-gardiste dont l'intérêt en santé publique est évident. Cependant, en dépit de tous les avantages qu'un tel système pourrait offrir, la méthode exploitée ne pourrait apporter le maximum de bénéfices que dans l'optique d'un système de monitoring intégral des résistances aux antipaludiques au moyen des approches diverses combinées. Un tel système est censé combiner les trois méthodes existantes pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques (essais *in vivo*, essais *in vitro/ ex vivo* et détection des MMR) [11]. Ce système pourrait idéalement bénéficier des avantages complémentaires offerts par chacune des méthodes, afin de donner aux décideurs sanitaires une évaluation plus complète de la situation et guider de la façon la plus appropriée les politiques antipaludiques [11]. La détection des MMR pourrait être alors utile au monitoring en routine de l'évolution et la cartographie de la résistance dans la population, à l'évaluation ponctuelle de cette prévalence dans des populations définies ou régions spécifiques et à l'évaluation des cas d'échec thérapeutique résultant des essais *in vivo*. Les autres méthodes de surveillance, régulièrement évoquées comme

étant soit techniquement plus lourdes ou soit probablement plus coûteuses [11, 41, 321], pourraient être réservées à des situations spécifiques comme la décision d'un changement radical de la politique thérapeutique (essais *in vivo*) ou l'introduction de nouvelles molécules thérapeutiques (essais *in vitro* / *ex vivo*). Mais la perspective d'une telle surveillance intégrale reste encore lointaine dans le contexte de la RDC (ressources limitées, territoire très vaste, haute endémicité, diversité des profils épidémiologiques, problèmes sécuritaires, etc.). Le système de surveillance des MMR, ayant démontré sa fonctionnalité, sa faisabilité et son utilité, pourrait être finalement perçu comme étant une solution transitoire vers le développement futur d'un système de surveillance intégrale.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a montré que la résistance du *P. falciparum* aux médicaments antipaludiques constitue un problème majeur de santé publique en RDC, au regard de la prévalence élevée pour les anciens médicaments de première ligne (comme la CQ et la SP) et, pour l'ART et ses dérivés, au regard de l'imminence d'une émergence locale ou d'une diffusion à partir des foyers sous régionaux. Les analyses faites ont ensuite laissé entrevoir que le développement de cette résistance pourrait avoir des intrications profondes avec les comportements en matière de recherche de soins, les disparités sociales et les conditions de vie de la population ainsi que l'organisation sanitaire dans le pays. Une surveillance épidémiologique régulière et à large échelle de cette résistance s'avère essentielle pour informer continuellement les décideurs sanitaires et guider de façon dynamique la politique sanitaire nationale. Cependant, les mécanismes existant pour effectuer cette surveillance, y compris au sein du PNLP, restaient très limités et faits principalement d'évaluations ponctuelles, sans processus de monitoring et assurées par des équipes indépendantes et diverses. Dans ce contexte, la présente thèse a démontré l'utilité épidémiologique de la surveillance moléculaire des parasites porteurs des mutations spécifiques reconnus comme étant des MMR aux antipaludiques. En effet, les méthodes moléculaires offrent la possibilité d'activités de surveillance à large échelle susceptibles de donner aux décideurs une vision plus large de la situation épidémiologique, y compris à l'échelle sous régionale, avec possibilité d'anticiper la pharmaco-résistance à un stade préclinique et de surveiller la résistance même aux médicaments déjà retirés de la pratique clinique. Cependant, la signification clinique de ces marqueurs à l'échelle individuelle des cas appelle à des précautions, les MMR correspondant plus à un agrégat du risque populationnel de développement de la résistance. Le système de surveillance moléculaire mis en place peut être perçu comme un jalon important posé dans la

perspective d'un système de surveillance intégrale de la résistance aux antipaludiques (censée combiner plusieurs approches) où la détection des MMR pourrait être appliquée comme une activité de routine. Les autres méthodes de surveillance, qui semblent plus coûteuses ou techniquement plus lourdes, pourraient être réservées plutôt à des situations spécifiques comme la décision d'un changement radical de la politique thérapeutique (essais *in vivo*) ou l'introduction de nouvelles molécules thérapeutiques (essais *in vitro* / *ex vivo*).

PERSPECTIVES

Nonobstant l'utilité manifeste du système de surveillance mis en place, sa faisabilité au long court nécessite des efforts supplémentaires de la part des responsables locaux dudit système et leurs partenaires, ainsi que de la part des décideurs politico-sanitaires nationaux et de la sous-région. Ces efforts sont de trois ordres et cadrent avec la poursuite des recherches, l'institutionnalisation du nouveau système de surveillance du paludisme pharmaco-résistant et l'organisation continue des activités de prévention et de contention de ce paludisme en RDC.

(1) Les perspectives de recherche

Des développements scientifiques sont nécessaires pour renforcer et/ou optimiser davantage le fonctionnement du réseau de surveillance établi et faciliter l'implémentation du nouvel outil dans la politique antipaludique nationale. Ainsi donc, les recherches fondamentales, cliniques, épidémiologiques et socio-économiques suivantes devront être poursuivies :

- L'identification et la validation des nouveaux MMR ou la validation des MMR déjà identifiés ailleurs (ex. les MMR de la *Pf*ART-R identifiés en Asie du Sud-Est) dans le contexte congolais et africain en général ;
- Des évaluations socio-économiques (notamment les évaluations des rapports coût-efficacité et coût-bénéfice) du système de surveillance nouvellement mis en place seront utiles pour appuyer les plaidoyers divers à mener ;
- L'optimisation des méthodes de détection des MMR au laboratoire du système de surveillance avec un possible virage vers le recours aux techniques de séquençage à haut débit les plus récentes dont les coûts, les facilités pratiques et les performances techniques sont particulièrement attractives ;

- Et en parallèle à la surveillance des MMR, la poursuite du développement et de l'évaluation de nouveaux outils de lutte antipaludique incluant des nouveaux médicaments, des nouvelles indications des médicaments existants (ex. les combinaisons S-P+DHA ou S-P+ DHA-PIP pour le TPIg en RDC), les vaccins antipaludiques et les mesures anti-vectorielles de nouvelle génération (ex. stérilisation des moustiques par modifications génétiques).

(2) Les perspectives pour l'institutionnalisation de la surveillance des MMR

Les responsables du programme devront mener des plaidoyers supplémentaires auprès des autorités du PNLP, du Ministère de la Santé et des partenaires divers de la santé en RDC. Ces plaidoyers devront viser spécifiquement les effets suivants :

- L'implémentation du programme de surveillance du paludisme pharmaco-résistant dans les documents normatifs de la lutte antipaludique nationale ;
- L'alignement de la surveillance de la pharmaco-résistance au sein des activités antipaludiques du PNLP bénéficiant ou devant bénéficier des financements multilatéraux d'origine gouvernementale ou non-gouvernementale ;
- La tenue régulière des réunions d'information conjointes avec les services techniques du PNLP et du Ministère de la Santé ainsi que les partenaires divers afin de discuter, dans un cadre multisectoriel, de l'état des lieux de la pharmaco-résistance et des mesures de santé publique à adopter ;
- Et un réseautage à établir avec les programmes similaires de surveillance de la résistance aux antipaludiques qui existent dans les pays de la sous-région, afin de mener des actions de portée plus globale.

(3) Les perspectives pour les actions de santé publique contre le paludisme pharmaco-résistant

Les actions à mener pour la prévention et/ou la contention du paludisme pharmaco-résistant sont nombreuses et la surveillance épidémiologique n'en constitue qu'un maillon, certes, essentiel. Ces activités incluent notamment :

- La surveillance épidémiologique continue et régulière du paludisme pharmaco-résistant en routine sur l'étendue du pays, avec extension des activités vers les provinces du Nord et du Centre du pays ;
- A côté de la surveillance épidémiologique, le renforcement des mesures visant à réduire la biomasse des parasites exposés à la pression médicamenteuse (les mesures générales de lutte anti-vectorielle, l'amélioration des conditions de vie et de l'environnement), à limiter les traitements incomplets ou de qualité inférieure et à éviter autant que possible la monothérapie. Pour y parvenir, cette thèse a démontré que, entre autres mesures possibles, la couverture complète par une police d'assurance est une stratégie pouvant contribuer à réduire à la fois les disparités sociales au sein de la population, les coûts élevés des soins antipaludiques encourus par les ménages, les pratiques thérapeutiques défectueuses et le temps perdu en dehors du circuit des soins officiels.
- Les autorités congolaises devront instaurer des contrôles aux frontières par un diagnostic ciblé et traitement des populations migrantes afin de limiter le risque de diffusion des parasites résistants. Et les observations faites dans cette thèse suggèrent que cette mesure est spécialement indiquée face au risque de diffusion possible de la *Pf*ART-R dans l'Est du pays en provenance éventuellement des pays limitrophes (exemple : Rwanda, Ouganda).
- Avec la surveillance épidémiologique des MMR, dès l'identification des premiers foyers intérieurs de paludisme résistant aux médicaments (ex.

*Pf*ART), le PNLP devra y organiser la recherche active et massive des souches résistantes et leur élimination par des thérapies alternatives et efficaces.

- A plus long terme, les parties prenantes devront envisager la création d'un système national de surveillance intégrale de la résistance en combinant la détection des MMR (en routine, selon un programme bisannuel) avec les TET (si besoin de changement de la politique thérapeutique) et les essais *in vitro/ex vivo* (si besoin d'introduire des médicaments nouveaux) pour rendre optimale la prise des décisions de santé publique face aux menaces du paludisme pharmaco-résistant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO: **Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010–2019)**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.
2. Ricci F: **Social implications of malaria and their relationships with poverty**. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2012, **4**.
3. Russell S: **The economic burden of illness for households in developing countries: a review of studies focusing on malaria, tuberculosis, and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome**. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2004, **71**:147-155.
4. Likwela JL: **Lutte antipaludique en République Démocratique du Congo à l'approche de l'échéance des OMD : progrès, défis et perspectives [Éditorial]**. *Rev méd Gd Lacs* 2014, **3**:149-155.
5. 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, **14**:354.
6. Mvumbi DM, Bobanga TL, Kayembe JN, Mvumbi GL, Situakibanza HN, Benoit-Vical F, Melin P, De Mol P, Hayette MP: **Molecular surveillance of Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies in the Democratic Republic of Congo**. *PLoS One* 2017, **12**:e0179142.
7. Menard D, Dondorp A: **Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination**. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2017, **7**:a025619.
8. Bloland PB: **Drug resistance in malaria**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
9. Björkman A, Bhattarai A: **Public health impact of drug resistant Plasmodium falciparum malaria**. *Acta Trop* 2005, **94**:163-169.
10. Plowe C: **Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence**. In *Malaria: drugs, disease and post-genomic biology*. Springer; 2005: 55-79.
11. Abdul-Ghani R, Al-Maktari MT, Al-Shibani LA, Allam AF: **A better resolution for integrating methods for monitoring Plasmodium falciparum resistance to antimalarial drugs**. *Acta tropica* 2014, **137**:44-57.
12. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K: **Standardizing the measurement of parasite clearance in falciparum malaria: the parasite clearance estimator**. *Malaria journal* 2011, **10**:339.
13. PNLP: **Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2016-2020**. Kinshasa, RD Congo: Ministère National de la Santé Publique, Programme de Lutte contre le Paludisme (PNLP); 2016.
14. Kayiba NK, Yobi DM, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Yamaoka Y, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Okitolonda Wemakoy E, De Mol P, Mvumbi GL, et al: **Spatial and molecular mapping of Pfk13 gene polymorphism in Africa in the era of emerging Plasmodium falciparum resistance to artemisinin: a systematic review**. *Lancet Infect Dis* 2021, **21**:e82-e92.

15. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B: **Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria.** *New England Journal of Medicine* 2014, **371**:411-423.
16. WHO: **World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020
17. Musuyi CN, Djourdebbe FB, Ekambi E: **Déterminants Individuels Et Contextuels Du Paludisme Chez Les Enfants De 6-59 Mois En République Démocratique Du Congo.** 2021.
18. Ntuku HMT: **Malaria epidemiology and key control interventions in the Democratic Republic of Congo.** Doctoral thesis, Faculty of Sciences, University of Basel; 2016.
19. PNLP: **Rapport annuel des activités de lutte contre le paludisme 2018.** Kinshasa, DRC: Ministère de la Santé, Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2018.
20. MPSMRM, MSP, ICF International: **Enquête Démographique et de Santé en République Démocratique du Congo 2013-2014 : Rapport de synthèse.** Rockville, Maryland, USA: Ministère du Plan et Suivi de la Mise en oeuvre de la Révolution de la Modernité (MPSMRM), Ministère de la Santé Publique (MSP) et ICF International; 2014.
21. Kayiba NK, Yobi DM, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Kabututu PZ, Likwela JL, Kalindula LA, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL: **Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo.** *Malaria journal* 2021, **20**:1-15.
22. WHO: **World Malaria Report 2018.** Switzerland, Geneva: World Health Organization (WHO); 2018.
23. PNLP: **Projet de politique nationale de lutte contre le paludisme.** Kinshasa, DRC: Ministère de la Santé, Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2014.
24. Taylor SM, Messina JP, Hand CC, Juliano JJ, Muwonga J, Tshefu AK, Atua B, Emch M, Meshnick SR: **Molecular malaria epidemiology: mapping and burden estimates for the Democratic Republic of the Congo, 2007.** *PloS one* 2011, **6**:e16420.
25. PNLP: **Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2007-2011.** Kinshasa, RDC: Ministère National de la Santé Publique, Programme de Lutte contre le Paludisme (PNLP); 2011.
26. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IR: **The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009.** *PLoS neglected tropical diseases* 2010, **4**:e774.
27. Rosenberg R: ***Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight?** *Trends in parasitology* 2007, **23**:193-196.
28. Karch S, Mouchet J: ***Anopheles paludis* vecteur important du paludisme au Zaïre.** *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 1992, **85**:388-389.
29. à Anvers T: **Note sur les anophèles à Kinshasa, Zaïre.** *Ann Soc belge Méd trop* 1937, **67**:375-379.
30. Bobanga T, Ayieko W, Zanga M, Umesumbu S, Landela A, Fataki O, Mandoko AS, Tshibamba J, Nyabola L: **Field efficacy and acceptability of PermaNet®**

- 3.0 and OlysetNet® in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Journal of vector borne diseases* 2013, **50**:206.
31. Basilua Kanza JP, El Fahime E, Alaoui S, Essassi EM, Brooke B, Nkebolo Malafu A, Watsenga Tezzo F: **Pyrethroid, DDT and malathion resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from the Democratic Republic of Congo.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2013, **107**:8-14.
32. Wat'Senga F, Manzambi EZ, Lunkula A, Mulumbu R, Mampangulu T, Lobo N, Hendershot A, Fornadel C, Jacob D, Niang M: **Nationwide insecticide resistance status and biting behaviour of malaria vector species in the Democratic Republic of Congo.** *Malaria journal* 2018, **17**:1-13.
33. PNLP: **Rapport annuel des activités de lutte contre le paludisme 2013.** Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2013.
34. PMI: **Democratic Republic of the Congo, Malaria Operational Plan FY.** President's Malaria Initiative (PMI); 2013.
35. PNLP: **Plan Stratégique National de Communication 2017-2020.** pp. 45 pages. Kinshasa, RDC: Ministère de la Santé Publique, Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP); 2017:45 pages.
36. PNLP: **Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2002-2006.** Kinshasa, RD Congo: Ministère National de la Santé, Programme de Lutte contre le Paludisme (PNLP); 2002.
37. Ntamabyaliro NY, Burri C, Nzolo DB, Engo AB, Lula YN, Mampunza SM, Nsibu CN, Mesia GK, Kayembe JN, Likwela JL, et al: **Drug use in the management of uncomplicated malaria in public health facilities in the Democratic Republic of the Congo.** *Malar J* 2018, **17**:189.
38. Ilunga H, Likwela J, Julo-Réminiac J-E, O'Reilly L, Kalemwa D, Lengeler C, Ntuku H, Tezzo F, Kibuchi E, Sang G: **An epidemiological profile of malaria in the Democratic Republic of Congo. A report prepared for the Federal Ministry of Health, Democratic Republic of Congo, the Roll Back Malaria Partnership and the Department for International Development, UK. March 2014.** pp. 922014:92.
39. PNLP: **Rapport annuel des activités de lutte contre le paludisme 2020.** Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2020.
40. PNLP: **Directives Nationale de prise en charge du Paludisme.** pp. 1-65: Ministère de la Santé Publique; 2017:1-65.
41. WHO: **Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
42. Basco L, Ringwald P: **Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches.** *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 2000, **10**:47-50.
43. Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH, Organization WH: *Chemotherapy of malaria.* World Health Organization; 1986.
44. Huang B, Deng C, Yang T, Xue L, Wang Q, Huang S, Su X-z, Liu Y, Zheng S, Guan Y, et al: **Polymorphisms of the artemisinin resistant marker (K13) in *Plasmodium falciparum* parasite populations of Grande Comore Island 10 years after artemisinin combination therapy.** *Parasites & vectors* 2015, **8**:634-634.

45. White NJ, Pongtavornpinyo W, Maude RJ, Saralamba S, Aguas R, Stepniewska K, Lee SJ, Dondorp AM, White LJ, Day NP: **Hyperparasitaemia and low dosing are an important source of anti-malarial drug resistance.** *Malaria journal* 2009, **8**:1-18.
46. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH: **Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives.** *Trends in parasitology* 2003, **19**:175-181.
47. Lin JT, Juliano JJ, Wongsrichanalai C: **Drug-resistant malaria: the era of ACT.** *Current infectious disease reports* 2010, **12**:165-173.
48. Saralamba S, Pan-Ngum W, Maude RJ, Lee SJ, Tarning J, Lindegårdh N, Chotivanich K, Nosten F, Day NP, Socheat D: **Intrahost modeling of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum.** *Proceedings of the national academy of sciences* 2011, **108**:397-402.
49. Ménard D, Arieu F, Mercereau-Puijalon O: **Étude de la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu).** *médecine/sciences* 2013, **29**:647-655.
50. Clyde DF, Hlaing N, Tin F: **Resistance to chloroquine of Plasmodium falciparum from Burma.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972, **66**:369-370.
51. Gregson A, Plowe CV: **Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates.** *Pharmacol Rev* 2005, **57**:117-145.
52. Wellems TE, Plowe CV: **Chloroquine-resistant malaria.** *J Infect Dis* 2001, **184**:770-776.
53. Packard RM: **The origins of antimalarial-drug resistance.** *New England Journal of Medicine* 2014, **371**:397-399.
54. Awasthi G, Satya GBK, Das A: **PfCRT haplotypes and the evolutionary history of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012, **107**:129-134.
55. Awasthi G, Das A: **Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013, **108**:947-961.
56. Gabryszewski SJ: **Dissecting the molecular basis of PfCRT-mediated antimalarial drug resistance.** Columbia University, 2016.
57. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T: **Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria.** *Science* 2004, **305**:1124.
58. Trape J-F, Pison G, Preziosi M-P, Enel C, du Loû AD, Delaunay V, Samb B, Lagarde E, Molez J-F, Simondon F: **Impact of chloroquine resistance on malaria mortality.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 1998, **321**:689-697.
59. Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Rieckmann K, Cheng Q: **Sulfadoxine resistance in Plasmodium vivax is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2214-2222.
60. Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE: **Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite Plasmodium falciparum is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:979-986.
61. Naidoo I, Roper C: **Mapping 'partially resistant', 'fully resistant', and 'super resistant' malaria.** *Trends in parasitology* 2013, **29**:505-515.
62. Divala TH, Cohee LM, Laufer MK: **The remarkable tenacity of sulfadoxine-pyrimethamine.** *The Lancet Infectious Diseases* 2019, **19**:460-461.

63. Desai M, Gutman J, Taylor SM, Wiegand RE, Khairallah C, Kayentao K, Ouma P, Coulibaly SO, Kalilani L, Mace KE, et al: **Impact of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance on Effectiveness of Intermittent Preventive Therapy for Malaria in Pregnancy at Clearing Infections and Preventing Low Birth Weight.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2016, **62**:323-333.
64. Ravenhall M, Benavente ED, Mipando M, Jensen AT, Sutherland CJ, Roper C, Sepúlveda N, Kwiatkowski DP, Montgomery J, Phiri KS, et al: **Characterizing the impact of sustained sulfadoxine/pyrimethamine use upon the Plasmodium falciparum population in Malawi.** *Malar J* 2016, **15**:575.
65. Chaturvedi R, Chhibber-Goel J, Verma I, Gopinathan S, Parvez S, Sharma A: **Geographical spread and structural basis of sulfadoxine-pyrimethamine drug-resistant malaria parasites.** *Int J Parasitol* 2021, **51**:505-525.
66. White NJ, Hien TT, Nosten FH: **A Brief History of Qinghaosu.** *Trends Parasitol* 2015, **31**:607-610.
67. Faurant C: **From bark to weed: the history of artemisinin.** *Parasite* 2011, **18**:215-218.
68. Leang R, Ros S, Duong S, Navaratnam V, Lim P, Arieu F, Kiechel J-R, Ménard D, Taylor WR: **Therapeutic efficacy of fixed dose artesunate-mefloquine for the treatment of acute, uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Kampong Speu, Cambodia.** *Malaria journal* 2013, **12**:1-7.
69. Nosten F, Van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway K, Brockman A, McGready R, Ter Kuile F, Looareesuwan S, White N: **Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study.** *The Lancet* 2000, **356**:297-302.
70. Mukherjee A, Gagnon D, Wirth DF, Richard D: **Inactivation of plasmepsins 2 and 3 sensitizes Plasmodium falciparum to the antimalarial drug piperazine.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2018, **62**:e02309-02317.
71. Thriemer K, Hong NV, Rosanas-Urgell A, Phuc BQ, Ha DM, Pockele E, Guetens P, Van NV, Duong TT, Amambua-Ngwa A: **Delayed parasite clearance after treatment with dihydroartemisinin-piperaquine in Plasmodium falciparum malaria patients in central Vietnam.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014, **58**:7049-7055.
72. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM: **Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia.** *New England Journal of Medicine* 2008, **359**:2619-2620.
73. Uwimana A, Legrand E, Stokes BH, Ndikumana J-LM, Warsame M, Umulisa N, Ngamije D, Munyaneza T, Mazarati J-B, Munguti K: **Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant Plasmodium falciparum kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda.** *Nature medicine* 2020, **26**:1602-1608.
74. Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S: **Local emergence in Amazonia of Plasmodium falciparum k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance.** 2020, **9**.
75. Ehrlich HY, Jones J, Parikh S: **Molecular surveillance of antimalarial partner drug resistance in sub-Saharan Africa: a spatial-temporal evidence mapping study.** *The Lancet Microbe* 2020, **1**:e209-e217.

76. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Jittamala P, Hanboonkunupakarn B, Chutasmit K, Saelow C: **Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study.** *The Lancet infectious diseases* 2019, **19**:952-961.
77. Phuc BQ, Rasmussen C, Duong TT, Dong LT, Loi MA, Ménard D, Tarning J, Bustos D, Ringwald P, Galappaththy GL: **Treatment failure of dihydroartemisinin/piperaquine for Plasmodium falciparum malaria, Vietnam.** *Emerging infectious diseases* 2017, **23**:715.
78. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiu-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y: **A worldwide map of Plasmodium falciparum K13-propeller polymorphisms.** *New England Journal of Medicine* 2016, **374**:2453-2464.
79. Yang C, Zhang H, Zhou R, Qian D, Liu Y, Zhao Y, Li S, Xu B: **Polymorphisms of Plasmodium falciparum k13-propeller gene among migrant workers returning to Henan Province, China from Africa.** *BMC Infectious Diseases* 2017, **17**.
80. Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, Von Seidlein L, Zhou H, Zhu G, Tang J, Liu Y, Wang W: **Emergence of indigenous artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Africa.** *New England Journal of Medicine* 2017, **376**:991-993.
81. Uwimana A, Umulisa N, Venkatesan M, Savigel SS, Zhou Z, Munyaneza T, Habimana RM, Rucogoza A, Moriarty LF, Sandford R: **Association of Plasmodium falciparum kelch13 R561H genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2021.
82. Bergmann C, van Loon W, Habarugira F, Tacoli C, Jäger JC, Savelsberg D, Nshimiyimana F, Rwamugema E, Mbarushimana D, Ndoli J: **Increase in Kelch 13 polymorphisms in Plasmodium falciparum, southern Rwanda.** *Emerging Infectious Diseases* 2021, **27**:294.
83. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuro OT, Tachibana SI, Yamauchi M, Opio W, Emoto S, Anywar DA, Kimura E, et al: **Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa.** 2021, **385**:1163-1171.
84. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I: **Drug resistance in Plasmodium.** *Nat Rev Microbiol* 2018, **16**:156-170.
85. Birnbaum J, Scharf S, Schmidt S, Jonscher E, Hoeijmakers WAM, Flemming S, Toenhake CG, Schmitt M, Sabitzki R, Bergmann B: **A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites.** *Science* 2020, **367**:51-59.
86. Henrici RC, Sutherland CJ: **Alternative pathway to reduced artemisinin susceptibility in Plasmodium falciparum.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, **115**:12556-12558.
87. WHO: **Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy: status report.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.
88. WHO: **Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.

89. Hedt BL, Laufer MK, Cohen T: **Drug resistance surveillance in resource-poor settings: current methods and considerations for TB, HIV, and malaria.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2011, **84**:192.
90. Gascoyne P, Satayavivad J, Ruchirawat M: **Microfluidic approaches to malaria detection.** *Acta tropica* 2004, **89**:357-369.
91. Sibley CH, Price RN: **Monitoring antimalarial drug resistance: applying lessons learned from the past in a fast-moving present.** *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2012, **2**:126-133.
92. Laufer MK: **Monitoring antimalarial drug efficacy: current challenges.** *Current infectious disease reports* 2009, **11**:59-65.
93. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B: **Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies.** *The Lancet infectious diseases* 2013, **13**:1043-1049.
94. Desjardins RE, Canfield C, Haynes J, Chulay J: **Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1979, **16**:710-718.
95. Malaria WEC: **WHO Expert Committee on Malaria: twentieth report.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
96. Plowe CV: **Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand.** *Journal of Experimental Biology* 2003, **206**:3745-3752.
97. Aubouy A, Jafari S, Huat V, Migot-Nabias F, Mayombo J, Durand R, Bakary M, Le Bras J, Deloron P: **DHFR and DHPS genotypes of Plasmodium falciparum isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, **52**:43-49.
98. Stepniewska K, Chotivanich K, Brockman A, Day NP, White NJ: **Overestimating resistance in field testing of malaria parasites: simple methods for estimating high EC 50 values using a Bayesian approach.** *Malaria journal* 2007, **6**:1-9.
99. Ringwald P, Basco L: **Comparison of in vivo and in vitro tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaoundé, Cameroon.** *Bulletin of the World Health Organization* 1999, **77**:34.
100. Basco L, Le Bras J: **Short-term in vitro culture of Plasmodium vivax and P. ovale for drug-susceptibility testing.** *Parasitology research* 1994, **80**:262-264.
101. Duru V, Witkowski B, Ménard D: **Plasmodium falciparum resistance to artemisinin derivatives and piperazine: a major challenge for malaria elimination in Cambodia.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2016, **95**:1228.
102. Mairé-Khedim M, Leang R, Marmai C, Khim N, Kim S, Ke S, Kaoy C, Kloeung N, Eam R, Chy S: **Clinical and in vitro resistance of Plasmodium falciparum to artesunate-amodiaquine in Cambodia.** *Clinical Infectious Diseases* 2021, **73**:406-413.
103. Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI, Howitt SM, Bröer S, Kirk K: **Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter.** *science* 2009, **325**:1680-1682.
104. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N: **A surrogate marker of piperazine-resistant Plasmodium**

- falciparum malaria: a phenotype–genotype association study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2017, **17**:174-183.
105. Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L: **A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 2014, **505**:50-55.
106. Anderson TJ, Roper C: **The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers.** *Acta tropica* 2005, **94**:269-280.
107. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, Meshnick SR, Mugittu K, Naidoo I, Price RN: **World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria.** *Malaria journal* 2007, **6**:1-10.
108. Eboumbou-Moukoko E, Bogreau H, Briolant S, Pradines B, Rogier C: **Marqueurs moléculaires des résistances de Plasmodium falciparum aux antipaludiques.** *Médecine tropicale* 2009, **69**:606-612.
109. Hastings IM: **Modelling parasite drug resistance: lessons for management and control strategies.** *Tropical Medicine & International Health* 2001, **6**:883-890.
110. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu A-L, Price RN, Ringwald P: **A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria.** *Malaria journal* 2009, **8**:1-15.
111. Plowe C: **Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence.** *Malaria: drugs, disease and post-genomic biology* 2005:55-79.
112. Björkman A: **Interactions between chemotherapy and immunity to malaria.** *Malaria Immunology* 1988:331-356.
113. Geerligs PDP, Brabin BJ, Eggelte TA: **Analysis of the effects of malaria chemoprophylaxis in children on haematological responses, morbidity and mortality.** *Bulletin of the World Health Organization* 2003, **81**:205-216.
114. Snow RW, Korenromp EL, Gouws E: **Pediatric mortality in Africa: Plasmodium falciparum malaria as a cause or risk?** *The Intolerable Burden of Malaria II: What's New, What's Needed: Supplement to Volume 71 (2) of the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004.
115. Trape J-F: **The public health impact of chloroquine resistance in Africa.** *The Intolerable Burden of Malaria: A New Look at the Numbers: Supplement to Volume 64 (1) of the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001.
116. Greenberg AE, Ntumbanzondo M, Ntula N, Mawa L, Howell J, Davachi F: **Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire.** *Bulletin of the World Health Organization* 1989, **67**:189.
117. Carinel B, du Bodan HG, Lalleinaiit M: **Infant and child mortality and malaria in the Congo. The trend in the suburbs of Brazzaville between 1981 and 1988.** 1992.
118. Kiszewski AE, Teklehaimanot A: **A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria.** *The Intolerable Burden of Malaria II: What's New, What's Needed: Supplement to Volume 71 (2) of the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004.
119. Resistance mRCPolAD: **malERA: An updated research agenda for insecticide and drug resistance in malaria elimination and eradication.** *PLoS Med* 2017, **14**:e1002450.

120. PNUD: **Rapport sur le développement humain 2014 : Pérenniser le progrès humain : réduire les vulnérabilités et renforcer la résilience, Programme des Nations Unies pour le développement.** New York, USA: Programme des Nations Unies pour le développement; 2014.
121. WHO: **Improving health system efficiency: Democratic Republic of the Congo, improving aid coordination in the health sector.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
122. Velavan TP, Nderu D, Agbenyega T, Ntoumi F, Kremsner PG: **An alternative dogma on reduced artemisinin susceptibility: A new shadow from east to west.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, **116**:12611-12612.
123. Tsombeng FF, Gendrot M, Robert MG, Madamet M, Pradines B: **Are k13 and plasmepsin II genes, involved in Plasmodium falciparum resistance to artemisinin derivatives and piperazine in Southeast Asia, reliable to monitor resistance surveillance in Africa?** *Malaria journal* 2019, **18**:285.
124. Bhatt S, Weiss D, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle K, Moyes C, Henry A, Eckhoff P: **The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015.** *Nature* 2015, **526**:207-211.
125. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ: **Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria.** *New England journal of medicine* 2009, **361**:455-467.
126. Amaratunga C, Sreng S, Suon S, Phelps ES, Stepniewska K, Lim P, Zhou C, Mao S, Anderson JM, Lindegardh N: **Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study.** *The Lancet infectious diseases* 2012, **12**:851-858.
127. Loy DE, Liu W, Li Y, Learn GH, Plenderleith LJ, Sundararaman SA, Sharp PM, Hahn BH: **Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax.** *International journal for parasitology* 2017, **47**:87-97.
128. Mita T, Tachibana S-I, Hashimoto M, Hirai M: **Plasmodium falciparum kelch 13: a potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites.** *Expert review of anti-infective therapy* 2016, **14**:125-135.
129. Wells TN, Van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC: **Malaria medicines: a glass half full?** *Nature Reviews Drug Discovery* 2015, **14**:424-442.
130. Geneva W, Organization WH: **Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy.** 2009.
131. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, Dacheux M, Khim N, Zhang L, Lam S: **K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates.** *Science* 2015, **347**:428-431.
132. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman D: **Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement.** *BMJ* 339: **b2535.** 2009.
133. Bernardo WM: **PRISMA statement and PROSPERO.** *International braz j urol* 2017, **43**:383-384.
134. Stang A: **Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses.** *European journal of epidemiology* 2010, **25**:603-605.

135. Den Dunnen J, Antonarakis S: **Nomenclature for the description of human sequence variations.** *Human genetics* 2001, **109**:121-124.
136. Ogino S, Gulley ML, Den Dunnen JT, Wilson RB, Training AfMP, Committee E: **Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges.** *The Journal of molecular diagnostics* 2007, **9**:1-6.
137. 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.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2018, **98**:1360-1366.
138. Wickham H: *ggplot2: elegant graphics for data analysis.* springer; 2016.
139. Kahle D, Wickham H: **ggmap: Spatial Visualization with ggplot2.** *The R journal* 2013, **5**:144-161.
140. Keitt TH: **rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library, R package version 0.6-28.** <http://cran.r-project.org/package=rgdal> 2010.
141. **R: A language and environment for statistical computing.** [<http://www.R-project.org/>]
142. Apinjoh TO, Mugri RN, Miotto O, Chi HF, Tata RB, Anchang-Kimbi JK, Fon EM, Tangoh DA, Nyingchu RV, Jacob C: **Molecular markers for artemisinin and partner drug resistance in natural Plasmodium falciparum populations following increased insecticide treated net coverage along the slope of mount Cameroon: cross-sectional study.** *Infectious diseases of poverty* 2017, **6**:136.
143. Asua V, Vinden J, Conrad MD, Legac J, Kigozi SP, Kamya MR, Dorsey G, Nsoby SL, Rosenthal PJ: **Changing Molecular Markers of Antimalarial Drug Sensitivity across Uganda.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019, **63**:e01818-01818.
144. Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana S-I, Auma M, Ntege EH, Ito D: **Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda.** *Malaria journal* 2017, **16**:23.
145. Bayih AG, Getnet G, Alemu A, Getie S, Mohon AN, Pillai DR: **A unique Plasmodium falciparum K13 gene mutation in northwest Ethiopia.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2016, **94**:132-135.
146. Boussaroque A, Fall B, Madamet M, Camara C, Benoit N, Fall M, Nakoulima A, Dionne P, Fall KB, Diatta B: **Emergence of mutations in the K13 propeller gene of Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal, in 2013-2014.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016, **60**:624-627.
147. Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kamya MR, Havlir DV, Dorsey G, Rosenthal PJ: **Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in Plasmodium falciparum isolated from Ugandan children.** *PloS one* 2014, **9**:e105690.
148. Cooper RA, Conrad MD, Watson QD, Huezo SJ, Ninsiima H, Tumwebaze P, Nsoby SL, Rosenthal PJ: **Lack of Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum in Uganda Based on Parasitological and Molecular Assays.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015, **59**:5061-5064.
149. Dama S, Niangaly H, Ouattara A, Sagara I, Sissoko S, Traore OB, Bamadio A, Dara N, Djimde M, Alhousseini ML, et al: **Reduced ex vivo susceptibility of Plasmodium falciparum after oral artemether-lumefantrine treatment in Mali.** *Malaria journal* 2017, **16**:59-59.

150. Dieye B, Affara M, Sangare L, Joof F, Ndiaye YD, Gomis JF, Ndiaye M, Mbaye A, Diakite M, Sy N, et al: **West Africa International Centers of Excellence for Malaria Research: Drug Resistance Patterns to Artemether-Lumefantrine in Senegal, Mali, and The Gambia.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2016, **95**:1054-1060.
151. Djaman JA, Olefongo D, Ako AB, Roman J, Ngane VF, Basco LK, Tahar R: **Molecular Epidemiology of Malaria in Cameroon and Côte d'Ivoire. XXXI. Kelch 13 Propeller Sequences in Plasmodium falciparum Isolates before and after Implementation of Artemisinin-Based Combination Therapy.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017, **97**:222-224.
152. Escobar C, Pateira S, Lobo E, Lobo L, Teodosio R, Dias F, Fernandes N, Arez AP, Varandas L, Nogueira F: **Polymorphisms in Plasmodium falciparum K13-propeller in Angola and Mozambique after the introduction of the ACTs.** *PloS one* 2015, **10**:e0119215-e0119215.
153. Guerra M, Neres R, Salgueiro P, Mendes C, Ndong-Mabale N, Berzosa P, de Sousa B, Arez AP: **Plasmodium falciparum genetic diversity in continental Equatorial Guinea before and after introduction of artemisinin-based combination therapy.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2017, **61**:e02556-02515.
154. Gupta H, Macete E, Buló H, Salvador C, Warsame M, Carvalho E, Ménard D, Ringwald P, Bassat Q, Enosse S, Mayor A: **Drug-Resistant Polymorphisms and Copy Numbers in Plasmodium falciparum, Mozambique, 2015.** *Emerging infectious diseases* 2018, **24**:40-48.
155. Hemming-Schroeder E, Umukoro E, Lo E, Fung B, Tomás-Domingo P, Zhou G, Zhong D, Dixit A, Atieli H, Githeko A: **Impacts of antimalarial drugs on Plasmodium falciparum drug resistance markers, Western Kenya, 2003–2015.** 2018.
156. Ogouyèmi-Hounto A, Damien G, Deme AB, Ndam NT, Assohou C, Tchoulin D, Mama A, Hounkpe VO, Moutouama JD, Remoué F, et al: **Lack of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum in northwest Benin after 10 years of use of artemisinin-based combination therapy.** *Parasite (Paris, France)* 2016, **23**:28-28.
157. Ikeda M, Kaneko M, Tachibana S-I, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Yamauchi M, Sekihara M, Hashimoto M: **Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates, Uganda, 2014–2016.** *Emerging infectious diseases* 2018, **24**:718.
158. Isozumi R, Uemura H, Kimata I, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, Kaneko A: **Novel mutations in K13 propeller gene of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum.** *Emerging infectious diseases* 2015, **21**:490-492.
159. Kakolwa MA, Mahende MK, Ishengoma DS, Mandara CI, Ngasala B, Kamugisha E, Kataraihya JB, Mandike R, Mkude S, Chacky F, et al: **Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy, and molecular markers for artemisinin and piperazine resistance in Mainland Tanzania.** *Malaria journal* 2018, **17**:369-369.
160. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, Mumba D, Kekre M, Yavo W, Mead D, et al: **K13-propeller polymorphisms in**

- Plasmodium falciparum parasites from sub-Saharan Africa. *The Journal of infectious diseases* 2015, 211:1352-1355.**
161. Kiaco K, Teixeira J, Machado M, do Rosário V, Lopes D: **Evaluation of artemether-lumefantrine efficacy in the treatment of uncomplicated malaria and its association with pfmdr1, pfatpase6 and K13-propeller polymorphisms in Luanda, Angola. *Malaria journal* 2015, 14:504-504.**
162. Koukouikila-Koussounda F, Jeyaraj S, Nguetse CN, Nkonganyi CN, Kokou KC, Etoka-Beka MK, Ntoumi F, Velavan TP: **Molecular surveillance of Plasmodium falciparum drug resistance in the Republic of Congo: four and nine years after the introduction of artemisinin-based combination therapy. *Malaria journal* 2017, 16:155-155.**
163. Leroy D, Macintyre F, Adamy M, Laurijssens B, Klopper R, Khim N, Legrand E, Wells TN, Ménard D: **High proportion of multiple copies of Plasmodium falciparum Plasmepsin-2 gene in African isolates: Is piperazine resistance emerging in Africa? *bioRxiv* 2018:361204.**
164. Anderson T, Nair S, White M, Cheeseman I, Nkhoma S, Bilgic F, McGready R, Ashley E, Phyo AP, White N: **Why are there so many independent origins of artemisinin resistance in malaria parasites? *bioRxiv* 2016:056291.**
165. Ljolje D, Dimbu PR, Kelley J, Goldman I, Nace D, Macaia A, Halsey ES, Ringwald P, Fortes F, Udhayakumar V, et al: **Prevalence of molecular markers of artemisinin and lumefantrine resistance among patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in three provinces in Angola, 2015. *Malaria journal* 2018, 17:84-84.**
166. Lucchi NW, Komino F, Okoth SA, Goldman I, Onyona P, Wiegand RE, Juma E, Shi YP, Barnwell JW, Udhayakumar V, Kariuki S: **In Vitro and Molecular Surveillance for Antimalarial Drug Resistance in Plasmodium falciparum Parasites in Western Kenya Reveals Sustained Artemisinin Sensitivity and Increased Chloroquine Sensitivity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, 59:7540-7547.**
167. Plucinski MM, Dimbu PR, Macaia AP, Ferreira CM, Samutondo C, Quivinja J, Afonso M, Kiniffo R, Mbounga E, Kelley JS, et al: **Efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, and dihydroartemisinin-piperazine for treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Angola, 2015. *Malaria journal* 2017, 16:62-62.**
168. Mayengue PI, Niamsa RF, Kouhounina Batsimba D, Malonga-Massanga A, Louzolo I, Loukabou Bongolo NC, Macosso L, Ibara Ottia R, Kimbassa Ngoma G, Dossou-Yovo LR, et al: **No polymorphisms in K13-propeller gene associated with artemisinin resistance in Plasmodium falciparum isolated from Brazzaville, Republic of Congo. *BMC infectious diseases* 2018, 18:538-538.**
169. Menard S, Tchoufack JN, Maffo CN, Nsango SE, Iriart X, Abate L, Tsapi MT, Awono-Ambéné PH, Abega Mekongo FA, Morlais I, Berry A: **Insight into k13-propeller gene polymorphism and ex vivo DHA-response profiles from Cameroonian isolates. *Malaria journal* 2016, 15:572-572.**
170. Hawkes M, Conroy AL, Opoka RO, Namasopo S, Zhong K, Liles WC, John CC, Kain KC: **Slow Clearance of Plasmodium falciparum in Severe Pediatric Malaria, Uganda, 2011-2013. *Emerging infectious diseases* 2015, 21:1237-1239.**

171. Miotto O, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, Lim P, Mead D, Oyola SO, Dhorda M: **Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum***. *Nature genetics* 2015, **47**:226-234.
172. Mita T, Culleton R, Takahashi N, Nakamura M, Tsukahara T, Hunja CW, Win ZZ, Htike WW, Marma AS, Dysoley L, et al: **Little Polymorphism at the K13 Propeller Locus in Worldwide *Plasmodium falciparum* Populations Prior to the Introduction of Artemisinin Combination Therapies**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016, **60**:3340-3347.
173. Muwanguzi J, Henriques G, Sawa P, Bousema T, Sutherland CJ, Beshir KB: **Lack of K13 mutations in *Plasmodium falciparum* persisting after artemisinin combination therapy treatment of Kenyan children**. *Malaria Journal* 2016, **15**:36.
174. Oboh MA, Ndiaye D, Antony HA, Badiane AS, Singh US, Ali NA, Bharti PK, Das A: **Status of Artemisinin Resistance in Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* from Molecular Analyses of the Kelch13 Gene in Southwestern Nigeria**. *BioMed Research International* 2018, **2018**:5.
175. Ocan M, Bwanga F, Okeng A, Katabazi F, Kigozi E, Kyobe S, Ogwal-Okeng J, Obua C: **Prevalence of K13-propeller gene polymorphisms among *Plasmodium falciparum* parasites isolated from adult symptomatic patients in northern Uganda**. *BMC infectious diseases* 2016, **16**:428.
176. Ouattara A, Kone A, Adams M, Fofana B, Maiga AW, Hampton S, Coulibaly D, Thera MA, Diallo N, Dara A: **Polymorphisms in the K13-propeller gene in artemisinin-susceptible *Plasmodium falciparum* parasites from Bougoula-Hameau and Bandiagara, Mali**. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2015, **92**:1202-1206.
177. Tumwebaze P, Tukwasibwe S, Taylor A, Conrad M, Ruhamyankaka E, Asua V, Walakira A, Nankabirwa J, Yeka A, Staedke SG, et al: **Changing Antimalarial Drug Resistance Patterns Identified by Surveillance at Three Sites in Uganda**. *The Journal of infectious diseases* 2017, **215**:631-635.
178. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, Goldman I, Lucchi N, Stennies G, MacArthur JR, Udhayakumar V: **Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uíge Provinces, Angola**. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, **59**:437-443.
179. Somé AF, Sorgho H, Zongo I, Bazié T, Nikiéma F, Sawadogo A, Zongo M, Compaoré Y-D, Ouédraogo J-B: **Polymorphisms in K13, pfprt, pfmdr1, pfdhfr, and pfphps in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Burkina Faso**. *Parasite (Paris, France)* 2016, **23**:60-60.
180. Tacoli C, Gai PP, Bayingana C, Sifft K, Geus D, Ndoli J, Sendegaya A, Gahutu JB, Mockenhaupt FP: **Artemisinin resistance-associated K13 polymorphisms of *Plasmodium falciparum* in Southern Rwanda, 2010–2015**. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2016, **95**:1090.
181. Talundzic E, Ndiaye YD, Deme AB, Olsen C, Patel DS, Biliya S, Daniels R, Vannberg FO, Volkman SK, Udhayakumar V, Ndiaye D: **Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* kelch13 Mutations in Senegal Determined by Using Targeted Amplicon Deep Sequencing**. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2017, **61**:e02116-02116.

182. Tawe L, Menegon M, Ramatlho P, Muthoga CW, Mutukwa N, Vurayai M, Bothudile W, Motshoge T, L'Episcopia M, Mosweunyane T, et al: **Molecular Surveillance of Plasmodium falciparum Drug Resistance Markers in Clinical Samples from Botswana.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2018, **99**:1499-1503.
183. Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, Dionne P, Ba Fall K, Nakoulima A, Diatta B, et al: **Limited polymorphisms in k13 gene in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal in 2012-2013.** *Malaria journal* 2014, **13**:472-472.
184. Torrentino-Madamet M, Collet L, Lepère JF, Benoit N, Amalvict R, Ménard D, Pradines B: **K13-Propeller Polymorphisms in Plasmodium falciparum Isolates from Patients in Mayotte in 2013 and 2014.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, **59**:7878-7881.
185. Madamet M, Kounta MB, Wade KA, Lo G, Diawara S, Fall M, Bercion R, Nakoulima A, Fall KB, Benoit N: **Absence of association between polymorphisms in the K13 gene and the presence of Plasmodium falciparum parasites at day 3 after treatment with artemisinin derivatives in Senegal.** *International journal of antimicrobial agents* 2017, **49**:754-756.
186. Voumbo-Matoumona DF, Akiana J, Madamet M, Kouna LC, Lekana-Douki JB, Pradines B: **High prevalence of Plasmodium falciparum antimalarial drug resistance markers in isolates from asymptomatic patients from the Republic of the Congo between 2010 and 2015.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2018, **14**:277-283.
187. Voumbo-Matoumona DF, Kouna LC, Madamet M, Maghendji-Nzondo S, Pradines B, Lekana-Douki JB: **Prevalence of Plasmodium falciparum antimalarial drug resistance genes in Southeastern Gabon from 2011 to 2014.** *Infection and drug resistance* 2018, **11**:1329-1338.
188. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F: **Absence of putative artemisinin resistance mutations among Plasmodium falciparum in sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study.** *The Journal of infectious diseases* 2014, **211**:680-688.
189. Dorkenoo AM, Yehadji D, Agbo YM, Layibo Y, Agbeko F, Adjeloh P, Yakpa K, Sossou E, Awokou F, Ringwald P: **Therapeutic efficacy trial of artemisinin-based combination therapy for the treatment of uncomplicated malaria and investigation of mutations in k13 propeller domain in Togo, 2012-2013.** *Malaria journal* 2016, **15**:331-331.
190. Amato R, Miotto O, Woodrow C, Almagro-Garcia J, Sinha I, Campino S, Mead D, Drury E, Kekre M, Sanders M, et al: *Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria.* 2016.
191. Escalante AA, Lal AA, Ayala FJ: **Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Genetics* 1998, **149**:189-202.
192. Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, MacInnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S: **Multiple populations of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Cambodia.** *Nature genetics* 2013, **45**:648.
193. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X-z, Berry A, Benoit-Vical F: **Increased tolerance to artemisinin in Plasmodium falciparum is**

- mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010, **54**:1872-1877.
194. Li G-Q, Guo X-B, Fu L-C, Jian H-X, Wang X-H: **Clinical trials of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria in China.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene* 1994, **88**:5-6.
195. Bonnington CA, Phyo AP, Ashley EA, Imwong M, Sripawat K, Parker DM, Proux S, White NJ, Nosten F: **Plasmodium falciparum Kelch 13 mutations and treatment response in patients in Hpa-Pun District, northern Kayin State, Myanmar.** *Malaria journal* 2017, **16**:1-7.
196. Cheeseman IH, McDew-White M, Phyo AP, Sripawat K, Nosten F, Anderson TJ: **Pooled sequencing and rare variant association tests for identifying the determinants of emerging drug resistance in malaria parasites.** *Molecular biology and evolution* 2015, **32**:1080-1090.
197. Wang J, Huang Y, Zhao Y, Ye R, Zhang D, Pan W: **Introduction of F446I mutation in the K13 propeller gene leads to increased ring survival rates in Plasmodium falciparum isolates.** *Malaria journal* 2018, **17**:248.
198. Group WKG-PS: **Association of mutations in the Plasmodium falciparum Kelch13 gene (Pf3D7_1343700) with parasite clearance rates after artemisinin-based treatments—a WWARN individual patient data meta-analysis.** *BMC medicine* 2019, **17**:1.
199. Wang Z, Shrestha S, Li X, Miao J, Yuan L, Cabrera M, Grube C, Yang Z, Cui L: **Prevalence of K13-propeller polymorphisms in Plasmodium falciparum from China-Myanmar border in 2007–2012.** *Malaria journal* 2015, **14**:168.
200. Singh GP, Goel P, Sharma A: **Structural mapping of Kelch13 mutations associated with artemisinin resistance in malaria.** *Journal of structural and functional genomics* 2016, **17**:51-56.
201. Demas AR, Sharma AI, Wong W, Early AM, Redmond S, Bopp S, Neafsey DE, Volkman SK, Hartl DL, Wirth DF: **Mutations in Plasmodium falciparum actin-binding protein coronin confer reduced artemisinin susceptibility.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, **115**:12799-12804.
202. Sharma AI, Demas AR, Hartl DL, Wirth DF: **Reply to Velavan et al.: Polymorphisms of pfcoronin in natural populations: Implications for functional significance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, **116**:12613-12614.
203. Yang C, Zhang H, Zhou R, Qian D, Liu Y, Zhao Y, Li S, Xu B: **Polymorphisms of Plasmodium falciparum k13-propeller gene among migrant workers returning to Henan Province, China from Africa.** *BMC infectious diseases* 2017, **17**:560.
204. Mvumbi D: **Place de la biologie moléculaire dans l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de la chimiorésistance du paludisme en République Démocratique du Congo.** Université de Kinshasa, 2017.
205. Yobi DM, Kayiba NK, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Likwela JL, De Mol P, Okitolonda EW, Speybroeck N, et al: **Molecular surveillance of anti-malarial drug resistance in Democratic Republic of Congo: high variability of chloroquinoreistance and lack of amodiaquinoreistance.** *Malar J* 2020, **19**:121.

206. Mvumbi D: **Mass intake of hydroxychloroquine or chloroquine in the present context of the Covid-19 outbreak: possible consequences in endemic malaria settings.** 2020.
207. Kayiba NK, Yobi DM, Kouoneyou VRT, Mvumbi DM, Kabututu PZ, Devleesschauwer B, Sompwe EM, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL: **Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of Plasmodium falciparum in Kingasani Hospital, Kinshasa in the Democratic Republic of Congo.** *Infection, Genetics and Evolution* 2021:105009.
208. Straimer J, Gandhi P, Renner KC, Schmitt EK: **High prevalence of P. falciparum K13 mutations in Rwanda is associated with slow parasite clearance after treatment with artemether-lumefantrine.** *The Journal of Infectious Diseases* 2021.
209. Elliott JH, Turner T, Clavisi O, Thomas J, Higgins JP, Mavergames C, Gruen RL: **Living systematic reviews: an emerging opportunity to narrow the evidence-practice gap.** *PLoS medicine* 2014, **11**:e1001603.
210. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG: **Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement.** *BMJ* 2009, **339**:b2535.
211. Bernardo WM: **PRISMA statement and PROSPERO.** *Int Braz J Urol* 2017, **43**:383-384.
212. Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P: **The Newcastle-Ottawa scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses.** *Ottawa: Ottawa Hospital Research Institute* 2011:1-12.
213. Chambers J: *Software for data analysis: programming with R.* Springer Science & Business Media; 2008.
214. Wickham H: **ggplot2.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 2011, **3**:180-185.
215. Yobi DM, Kayiba NK, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Umesumbu SE, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP: **Assessment of Plasmodium falciparum anti-malarial drug resistance markers in pfk13-propeller, pfprt and pfmdr1 genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018-2019.** *Malar J* 2021, **20**:144.
216. Leroy D, Macintyre F, Adoke Y, Ouoba S, Barry A, Mombo-Ngoma G, Ngomo JMN, Varo R, Dossou Y, Tshefu AK: **African isolates show a high proportion of multiple copies of the Plasmodium falciparum plasmepsin-2 gene, a piperaquine resistance marker.** *Malaria journal* 2019, **18**:1-11.
217. Mobula L, Lilley B, Tshefu AK, Rosenthal PJ: **Resistance-mediating polymorphisms in Plasmodium falciparum infections in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2009, **80**:555-558.
218. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kumpornsin K, Takala-Harrison S, Witkowski B, Fairhurst RM, Arieu F: **Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer Plasmodium falciparum resistance to the first-line antimalarial piperaquine.** *Nature communications* 2018, **9**:1-13.
219. Boonyalai N, Vesely BA, Thamnurak C, Praditpol C, Fagnark W, Kirativanich K, Saingam P, Chaisatit C, Lertsathakarn P, Gosi P: **Piperaquine resistant**

- Cambodian Plasmodium falciparum clinical isolates: in vitro genotypic and phenotypic characterization.** *Malaria journal* 2020, **19**:1-13.
220. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Neal AT, Sreng S, Suon S: **Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperaquine failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2017, **17**:164-173.
 221. van der Velden M, Rijpma SR, Russel FG, Sauerwein RW, Koenderink JB: **Pf MDR2 and Pf MDR5 are dispensable for Plasmodium falciparum asexual parasite multiplication but change in vitro susceptibility to anti-malarial drugs.** *Malaria journal* 2015, **14**:1-7.
 222. Fried M, Duffy PE: **Malaria during pregnancy.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2017, **7**:a025551.
 223. Ruh E, Bateko JP, Imir T, Taylan-Ozkan A: **Investigation of pregnancy-associated malaria by microscopy, rapid diagnostic test and PCR in Bandundu, the Democratic Republic of Congo.** *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2018, **112**:8-13.
 224. Harrington WE, Mutabingwa TK, Kabyemela E, Fried M, Duffy PE: **Intermittent treatment to prevent pregnancy malaria does not confer benefit in an area of widespread drug resistance.** *Clinical Infectious Diseases* 2011, **53**:224-230.
 225. Ocan M, Akena D, Nsobya S, Kamya MR, Senono R, Kinengyere AA, Obuku EA: **Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors.** *Malaria journal* 2019, **18**:1-15.
 226. Baraka V, Mavoko HM, Nabasumba C, Francis F, Lutumba P, Alifrangis M, Van Geertruyden J-P: **Impact of treatment and re-treatment with artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine on selection of Plasmodium falciparum multidrug resistance gene-1 polymorphisms in the Democratic Republic of Congo and Uganda.** *PLoS One* 2018, **13**:e0191922.
 227. Leroy D, Macintyre F, Adoke Y, Ouoba S, Barry A, Mombo-Ngoma G, Ndong Ngomo JM, Varo R, Dossou Y, Tshefu AK, et al: **African isolates show a high proportion of multiple copies of the Plasmodium falciparum plasmepsin-2 gene, a piperaquine resistance marker.** *Malar J* 2019, **18**:126.
 228. Tsombeng FF, Gendrot M, Robert MG, Madamet M, Pradines B: **Are k13 and plasmepsin II genes, involved in Plasmodium falciparum resistance to artemisinin derivatives and piperaquine in Southeast Asia, reliable to monitor resistance surveillance in Africa?** *Malaria journal* 2019, **18**:1-6.
 229. de Wit M, Funk AL, Moussally K, Nkuba DA, Siddiqui R, Bil K, Piriou E, Bart A, Bizoza PB, Bousema T: **In vivo efficacy of artesunate–amodiaquine and artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria: an open-randomized, non-inferiority clinical trial in South Kivu, Democratic Republic of Congo.** *Malaria journal* 2016, **15**:1-10.
 230. Muhindo Mavoko H, Kalabuanga M, Delgado-Ratto C, Maketa V, Mukele R, Fungula B, Inocência da Luz R, Rosanas-Urgell A, Lutumba P, Van Geertruyden J-P: **Uncomplicated clinical malaria features, the efficacy of artesunate-amodiaquine and their relation with multiplicity of infection in the Democratic Republic of Congo.** *PLoS One* 2016, **11**:e0157074.
 231. Onyamboko MA, Hoglund RM, Lee SJ, Kabedi C, Kayembe D, Badjanga BB, Turner GD, Jackson NV, Tarning J, McGready R: **A randomized controlled trial**

- of three-versus five-day artemether-lumefantrine regimens for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy in Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2020, **64**:e01140-01119.
232. Stokes BH, Dhingra SK, Rubiano K: **Plasmodium falciparum K13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness.** 2021, **10**.
233. Paloque L, Coppée R, Stokes BH, Gnädig NF, Niaré K, Augereau J-M, Fidock DA, Clain J, Benoit-Vical F: **Mutation in Plasmodium falciparum BTB/POZ domain of K13 protein confers artemisinin resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2021:AAC. 01320-01321.
234. van Eijk AM, Larsen DA, Kayentao K, Koshy G, Slaughter DE, Roper C, Okell LC, Desai M, Gutman J, Khairallah C: **Effect of Plasmodium falciparum sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis.** *The Lancet Infectious Diseases* 2019, **19**:546-556.
235. Minja DT, Schmiegelow C, Mmbando B, Boström S, Oesterholt M, Magistrado P, Pehrson C, John D, Salanti A, Luty AJ: **Plasmodium falciparum mutant haplotype infection during pregnancy associated with reduced birthweight, Tanzania.** *Emerging infectious diseases* 2013, **19**:1446.
236. Baraka V, Delgado-Ratto C, Nag S, Ishengoma DS, Madebe RA, Mavoko HM, Nabasumba C, Lutumba P, Alifrangis M, Van Geertruyden J-P: **Different origin and dispersal of sulfadoxine-resistant Plasmodium falciparum haplotypes between Eastern Africa and Democratic Republic of Congo.** *International journal of antimicrobial agents* 2017, **49**:456-464.
237. Nkoli Mandoko P, Rouvier F, Matendo Kakina L, Moke Mbongi D, Latour C, Losimba Likwela J, Ngoyi Mumba D, Bi Shamamba SK, Tamfum Muyembe J-J, Muepu Tshilolo L: **Prevalence of Plasmodium falciparum parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in the Democratic Republic of the Congo: emergence of highly resistant pfdhfr/pfdhps alleles.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018, **73**:2704-2715.
238. Desai M, Hill J, Fernandes S, Walker P, Pell C, Gutman J, Kayentao K, Gonzalez R, Webster J, Greenwood B: **Prevention of malaria in pregnancy.** *The Lancet infectious diseases* 2018, **18**:e119-e132.
239. Chico RM, Chaponda EB, Ariti C, Chandramohan D: **Sulfadoxine-pyrimethamine exhibits dose-response protection against adverse birth outcomes related to malaria and sexually transmitted and reproductive tract infections.** *Clinical Infectious Diseases* 2017, **64**:1043-1051.
240. Capan M, Mombo-Ngoma G, Makristathis A, Ramharter M: **Anti-bacterial activity of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: comparative in vitro study of sulphadoxine-pyrimethamine, mefloquine, and azithromycin.** *Malaria journal* 2010, **9**:303.
241. Church JA, Fitzgerald F, Walker AS, Gibb DM, Prendergast AJ: **The expanding role of co-trimoxazole in developing countries.** *The Lancet Infectious Diseases* 2015, **15**:327-339.
242. Roh ME, Ter Kuile FO, Rerolle F, Glymour MM, Shiboski S, Gosling R, Gutman J, Kakuru A, Desai M, Kajubi R: **Overall, anti-malarial, and non-malarial effect of intermittent preventive treatment during pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine on birthweight: a mediation analysis.** *The Lancet Global Health* 2020, **8**:e942-e953.

243. WHO: **Intermittent preventive treatment for infants using sulfadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for malaria control in Africa: implementation field guide**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
244. Walker PG, ter Kuile FO, Garske T, Menendez C, Ghani AC: **Estimated risk of placental infection and low birthweight attributable to Plasmodium falciparum malaria in Africa in 2010: a modelling study**. *The Lancet Global Health* 2014, **2**:e460-e467.
245. McGready R, Nosten F: **Proxies and prevention of malaria in pregnancy**. *The Lancet Infectious Diseases* 2012, **12**:902-903.
246. USAID: **The US President's Malaria Initiative in the Democratic Republic of Congo: Malaria Operational Plan FY 2017** 2017.
247. WHO: **WHO Policy Brief for the Implementation of Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy Using Sulfadoxine-Pyrimethamine (IPTp-SP)**. Switzerland, Geneva: World Health Organization; 2013.
248. ter Kuile FO, van Eijk AM, Filler SJ: **Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review**. *Jama* 2007, **297**:2603-2616.
249. Eisele TP, Larsen DA, Anglewicz PA, Keating J, Yukich J, Bennett A, Hutchinson P, Steketee RW: **Malaria prevention in pregnancy, birthweight, and neonatal mortality: a meta-analysis of 32 national cross-sectional datasets in Africa**. *The Lancet infectious diseases* 2012, **12**:942-949.
250. Kalilani-Phiri L, Thesing PC, Nyirenda OM, Mawindo P, Madanitsa M, Membe G, Wylie B, Masonbrink A, Makwakwa K, Kamiza S: **Timing of malaria infection during pregnancy has characteristic maternal, infant and placental outcomes**. *PLoS One* 2013, **8**:e74643.
251. Kern SE, Tiono AB, Makanga M, Gbadoé AD, Premji Z, Gaye O, Sagara I, Ubben D, Cousin M, Oladiran F: **Community screening and treatment of asymptomatic carriers of Plasmodium falciparum with artemether-lumefantrine to reduce malaria disease burden: a modelling and simulation analysis**. *Malaria journal* 2011, **10**:210.
252. Alker AP, Kazadi WM, Kutelemini AK, Boland PB, Tshefu AK, Meshnick SR: **dhfr and dhps genotype and sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in children with falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo**. *Tropical Medicine & International Health* 2008, **13**:1384-1391.
253. Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T: **Origin and evolution of sulfadoxine resistant Plasmodium falciparum**. *PLoS pathogens* 2010, **6**:e1000830.
254. Likwela JL, D'Alessandro U, Lokwa BL, Meuris S, Dramaix MW: **Sulfadoxine-pyrimethamine resistance and intermittent preventive treatment during pregnancy: a retrospective analysis of birth weight data in the Democratic Republic of Congo (DRC)**. *Tropical Medicine & International Health* 2012, **17**:322-329.
255. Uneke C: **Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications**. *Parasitology research* 2008, **102**:333-342.
256. Kozycki CT, Umulisa N, Rulisa S, Mwikarago EI, Musabyimana JP, Habimana JP, Karema C, Krogstad DJ: **False-negative malaria rapid diagnostic tests in**

- Rwanda: impact of Plasmodium falciparum isolates lacking hrp2 and declining malaria transmission. *Malaria journal* 2017, 16:123.**
257. Grüner N, Stambouli O, Ross RS: **Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2015:e52619.**
 258. Cnops L, Jacobs J, Van Esbroeck M: **Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed Plasmodium infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2011, 17:1101-1107.**
 259. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC: **Plasmodium falciparum: Detection of Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthetase Genes by PCR and Restriction Digestion. *Experimental parasitology* 1998, 89:1-8.**
 260. Molina-Cruz A, DeJong RJ, Ortega C, Haile A, Abban E, Rodrigues J, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C: **Some strains of Plasmodium falciparum, a human malaria parasite, evade the complement-like system of Anopheles gambiae mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109:E1957-E1962.**
 261. Verity R, Aydemir O, Brazeau NF, Watson OJ, Hathaway NJ, Mwandagaliirwa MK, Marsh PW, Thwai K, Fulton T, Denton M: **The impact of antimalarial resistance on the genetic structure of Plasmodium falciparum in the DRC. *Nature Communications* 2020, 11:1-10.**
 262. De Kock M, Tarning J, Workman L, Nyunt M, Adam I, Barnes K, Denti P: **Pharmacokinetics of sulfadoxine and pyrimethamine for intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy and after delivery. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 2017, 6:430-438.**
 263. Deloron P, Bertin G, Briand V, Massougbedji A, Cot M: **Sulfadoxine/pyrimethamine intermittent preventive treatment for malaria during pregnancy. *Emerging infectious diseases* 2010, 16:1666.**
 264. Radeva-Petrova D, Kayentao K, ter Kuile FO, Sinclair D, Garner P: **Drugs for preventing malaria in pregnant women in endemic areas: any drug regimen versus placebo or no treatment. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014, 2014:CD000169-CD000169.**
 265. WHO: **WHO Evidence Review Group: Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy (IPTp) with Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP). WHO Geneva; 2012.**
 266. Swarthout T, Van Den Broek I, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C: **Artesunate+ amodiaquine and artesunate+ sulphadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes. *Tropical Medicine & International Health* 2006, 11:1503-1511.**
 267. Gosling RD, Gesase S, Mosha JF, Carneiro I, Hashim R, Lemnge M, Mosha FW, Greenwood B, Chandramohan D: **Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2009, 374:1521-1532.**
 268. Nankabirwa J, Cundill B, Clarke S, Kabatereine N, Rosenthal PJ, Dorsey G, Brooker S, Staedke SG: **Efficacy, safety, and tolerability of three regimens for**

- prevention of malaria: a randomized, placebo-controlled trial in Ugandan schoolchildren. *PloS one* 2010, **5**:e13438.
269. Divala TH, Mungwira RG, Laufer MK: **Moving targets: The challenges of studying infectious diseases among pregnant women in resource limited settings.** *Vaccine* 2015, **33**:6401-6405.
270. WHO: **World Malaria Report 2017.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017.
271. Okorosobo T, Okorosobo F, Mwabu G, Orem JN, Kirigia JM: **Economic burden of malaria in six countries of Africa.** *Eur J Bus Manag* 2011, **3**:42-63.
272. Gallup JL, Sachs JD: **The economic burden of malaria.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2001, **64**:85-96.
273. INS: **Enquête par grappes à indicateurs multiples, 2017-2018, rapport de résultats de l'enquête.** . Kinshasa, République Démocratique du Congo: Institut national de la Statistique.
274. Ilunga-Ilunga F, Leveque A, Dramaix M: **Funding of the management of severe malaria in children by Kinshasa households (Democratic Republic of Congo).** *Sante Publique* 2015, **27**:863-869.
275. Sachs J, Malaney P: **The economic and social burden of malaria.** *Nature* 2002, **415**:680-685.
276. Chuma J, Gilson L, Molyneux C: **Treatment-seeking behaviour, cost burdens and coping strategies among rural and urban households in Coastal Kenya: an equity analysis.** *Tropical Medicine & International Health* 2007, **12**:673-686.
277. Deressa W, Ali A, Hailemariam D: **Malaria-related health-seeking behaviour and challenges for care providers in rural Ethiopia: implications for control.** *Journal of biosocial science* 2008, **40**:115-135.
278. Chuma J, Okungu V, Molyneux C: **The economic costs of malaria in four Kenyan districts: do household costs differ by disease endemicity?** *Malaria Journal* 2010, **9**:149.
279. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ: **Malaria.** *Lancet* 2018, **391**:1608-1621.
280. WHO: **World malaria report 2019.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019.
281. Nkemba B, Cishibanji M, Bashi-Mulenda M, Mashimango B: **Prise en charge et coût des soins d'un épisode du paludisme dans la zone de santé de Miti-Murhesa, République Démocratique du Congo.** 2014, **8**:7.
282. Mpanya G, Tshetu A, Likwela JL: **The malaria testing and treatment market in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, 2013.** *Malaria journal* 2017, **16**:94.
283. Ferrari G, Ntuku HM, Burri C, Tshetu AK, Duparc S, Hugo P, Mitembo DK, Ross A, Ngwala PL, Luwawu JN: **An operational comparative study of quinine and artesunate for the treatment of severe malaria in hospitals and health centres in the Democratic Republic of Congo: the MATIAS study.** *Malaria journal* 2015, **14**:226.
284. Janssen B, Cabases J, Szende A: **Self-reported population health: an international perspective based on EQ-5D.** Springer Netherlands; 2014.
285. Van Hout B, Janssen M, Feng Y-S, Kohlmann T, Busschbach J, Golicki D, Lloyd A, Scalone L, Kind P, Pickard AS: **Interim scoring for the EQ-5D-5L: mapping the EQ-5D-5L to EQ-5D-3L value sets.** *Value in health* 2012, **15**:708-715.

286. Jo C: **Cost-of-illness studies: concepts, scopes, and methods.** *Clinical and molecular hepatology* 2014, **20**:327.
287. Tai B-WB, Bae YH, Le QA: **A systematic review of health economic evaluation studies using the patient's perspective.** *Value in Health* 2016, **19**:903-908.
288. Hussmanns R, Mehran F, Varmā V: *Surveys of economically active population, employment, unemployment, and underemployment: an ILO manual on concepts and methods.* International Labour Organization; 1990.
289. Gusi N, Olivares P, Rajendram R: **The EQ-5D health-related quality of life questionnaire.** *Handbook of disease burdens and quality of life measures* New York: Springer 2010:87-99.
290. Jelsma J, Hansen K, De Weerd W, De Cock P, Kind P: **How do Zimbabweans value health states?** *Population health metrics* 2003, **1**:11.
291. Jia T-W, Utzinger J, Deng Y, Yang K, Li Y-Y, Zhu J-H, King CH, Zhou X-N: **Quantifying quality of life and disability of patients with advanced schistosomiasis japonica.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e966.
292. Briggs A, Sculpher M, Claxton K: *Decision modelling for health economic evaluation.* Oup Oxford; 2006.
293. Singh MP, Saha KB, Chand SK, Sabin LL: **The economic cost of malaria at the household level in high and low transmission areas of central India.** *Acta tropica* 2019, **190**:344-349.
294. Moreno-Gutierrez D, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Bilcke J, Barboza JL, Hayette M-P, Contreras-Mancilla J, Aguirre K, Gamboa D, Rodriguez H: **Economic costs analysis of uncomplicated malaria case management in the Peruvian Amazon.** *Malaria journal* 2020, **19**:1-16.
295. White MT, Conteh L, Cibulskis R, Ghani AC: **Costs and cost-effectiveness of malaria control interventions-a systematic review.** *Malaria journal* 2011, **10**:337.
296. Thiongane M: **Le Coût Economique du paludisme au Sénégal.** 2015.
297. Obieche OA, Odili VU: **Evaluation of cost of treatment of malaria in adults in Benin City, Nigeria: patients' perspective.** *Malaria World Journal* 2016, **7**.
298. Lima IdS, Duarte EC: **Factors associated with timely treatment of malaria in the Brazilian Amazon: a 10-year population-based study.** *Revista Panamericana de Salud Pública* 2017, **41**:e100.
299. Galactionova K, Tediosi F, De Savigny D, Smith T, Tanner M: **Effective coverage and systems effectiveness for malaria case management in sub-Saharan African countries.** *PloS one* 2015, **10**.
300. Mavoko HM, Ilombe G, da Luz RI, Kutekemeni A, Lutumba P: **Malaria policies versus practices, a reality check from Kinshasa, the capital of the Democratic Republic of Congo.** *BMC public health* 2015, **15**:352.
301. MSP: **Plan National de Développement Sanitaire recadré pour la période 2019-2022 : Vers la couverture sanitaire universelle.** pp. 1-86. Kinshasa, RDC: Ministère de la Santé Publique; 2018:1-86.
302. Dalaba MA, Welaga P, Oduro A, Danchaka LL, Matsubara C: **Cost of malaria treatment and health seeking behaviour of children under-five years in the Upper West Region of Ghana.** *PloS one* 2018, **13**.
303. Hailu A, Lindtjørn B, Deressa W, Gari T, Loha E, Robberstad B: **Economic burden of malaria and predictors of cost variability to rural households in south-central Ethiopia.** *PloS one* 2017, **12**.

304. Koné I, Marschall P, Flessa S: **Costing of malaria treatment in a rural district hospital.** *Health* 2010, **2**:759.
305. Kyaw SS, Drake T, Ruangveerayuth R, Chierakul W, White NJ, Newton PN, Lubell Y: **Cost of treating inpatient falciparum malaria on the Thai-Myanmar border.** *Malaria journal* 2014, **13**:416.
306. Jimam NS, Ismail NE: **Uncomplicated Malaria Management Practices and Cost of Illness Implications on Patients in Nigeria: A Systematic Review of Evidence.** *Systematic Reviews in Pharmacy* 2019, **10**:9.
307. Group WB: *World development indicators 2017*. World Bank; 2017.
308. Alonso S, Chaccour CJ, Elobolobo E, Nacima A, Candrinho B, Saifodine A, Saute F, Robertson M, Zulliger R: **The economic burden of malaria on households and the health system in a high transmission district of Mozambique.** *Malaria journal* 2019, **18**:1-10.
309. Musumba M, Egbendewe-Mondzozo A, McCarl BA: **Analysis of the Cost of Malaria in Children and Use of Insecticide-treated Bednets in Africa: Analysis of the Cost of Malaria in Children.** *African Development Review* 2014, **26**:74-87.
310. WHO: *Guidelines for the treatment of malaria*. Switzerland, Geneva: World Health Organization; 2015.
311. Yobi DM, Kayiba NK, Mvumbi DM, Boreux R, Bontems S, Kabututu PZ, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP: **The lack of K13-propeller mutations associated with artemisinin resistance in Plasmodium falciparum in Democratic Republic of Congo (DRC).** *PLoS One* 2020, **15**:e0237791.
312. Runtuwene LR, Tuda JS, Mongan AE, Makalowski W, Frith MC, Imwong M, Srisutham S, Thi LAN, Tuan NN, Eshita Y: **Nanopore sequencing of drug-resistance-associated genes in malaria parasites, Plasmodium falciparum.** *Scientific reports* 2018, **8**:1-13.
313. Razook Z, Mehra S, Gilchrist B, Utama D, Lautu-Gumal D, Fola A, Menard D, Kazura J, Laman M, Mueller I: **Real time, field-deployable whole genome sequencing of malaria parasites using nanopore technology.** *bioRxiv* 2020.
314. Imai K, Tarumoto N, Runtuwene LR, Sakai J, Hayashida K, Eshita Y, Maeda R, Tuda J, Ohno H, Murakami T: **An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of Plasmodium falciparum with MinION nanopore sequencer.** *Malaria journal* 2018, **17**:1-11.
315. Amelo W, Makonnen E: **Efforts Made to Eliminate Drug-Resistant Malaria and Its Challenges.** *BioMed Research International* 2021, **2021**.
316. RTS SCTP: **Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial.** *The Lancet* 2015, **386**:31-45.
317. Han L, Hudgens MG, Emch ME, Juliano JJ, Keeler C, Martinson F, Kamthunzi P, Tegha G, Lievens M, Hoffman IF: **RTS, S/AS01 malaria vaccine efficacy is not modified by seasonal precipitation: results from a phase 3 randomized controlled trial in Malawi.** *Scientific reports* 2017, **7**:1-8.
318. Ngatu NR, Kanbara S, Renzaho A, Wumba R, Mbelambela EP, Muchanga SM, Muzembo BA, Leon-Kabamba N, Nattadech C, Suzuki T: **Environmental and sociodemographic factors associated with household malaria burden in the Congo.** *Malaria journal* 2019, **18**:1-9.

319. Andolina C, Rek JC, Briggs J, Okoth J, Musiime A, Ramjith J, Teyssier N, Conrad M, Nankabirwa JI, Lanke K: **Sources of persistent malaria transmission in a setting with effective malaria control in eastern Uganda: a longitudinal, observational cohort study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2021.
320. WHO: **Economie de la santé: Principes d'évaluation économique pour les responsables des programmes de contrôle des maladies tropicales.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
321. Apinjoh TO, Ouattara A, Titanji VPK, Djimde A, Amambua-Ngwa A: **Genetic diversity and drug resistance surveillance of Plasmodium falciparum for malaria elimination: is there an ideal tool for resource-limited sub-Saharan Africa?** 2019, **18**:217.
322. Antonia AL, Taylor SM, Janko M, Emch M, Tshefu AK, Meshnick SR: **A cross-sectional survey of Plasmodium falciparum pfprt mutant haplotypes in the Democratic Republic of Congo.** *Am J Trop Med Hyg* 2014, **90**:1094-1097.
323. Cohuet S, Bonnet M, Van Herp M, Van Overmeir C, D'Alessandro U, Guthmann J-P: **molecular markers associated with Plasmodium falciparum resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the Democratic Republic of Congo.** 2006.
324. Deutsch-Feldman M, Aydemir O, Carrel M, Brazeau NF, Bhatt S, Bailey JA, Kashamuka M, Tshefu AK, Taylor SM, Juliano JJ: **The changing landscape of Plasmodium falciparum drug resistance in the Democratic Republic of Congo.** *BMC infectious diseases* 2019, **19**:1-10.
325. Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, Mumba D, Kekre M, Yavo W, Mead D: **K13-propeller polymorphisms in Plasmodium falciparum parasites from sub-Saharan Africa.** *The Journal of infectious diseases* 2015, **211**:1352-1355.
326. van Lenthe M, van der Meulen R, Lassovski M, Ouabo A, Bakula E, Badio C, Cibenda D, Okell L, Piriou E, Grignard L, et al: **Markers of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Eastern Democratic Republic of Congo; implications for malaria chemoprevention.** *Malar J* 2019, **18**:430.
327. Mens PF, van Overmeir C, Bonnet M, Dujardin JC, d'Alessandro U: **Real-time PCR/MCA assay using fluorescence resonance energy transfer for the genotyping of resistance related DHPS-540 mutations in Plasmodium falciparum.** *Malar J* 2008, **7**:48.
328. Mvumbi DM, Boreux R, Sacheli R, Lelo M, Lengu B, Nani-Tuma S, Melin P, Ntumba K, Lunganza K, DeMol P, Hayette MP: **Assessment of pfprt 72-76 haplotypes eight years after chloroquine withdrawal in Kinshasa, Democratic Republic of Congo.** *Malar J* 2013, **12**:459.
329. Ruh E, Bateko JP, Imir T, Taylan-Ozkan A: **Molecular identification of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria infected women who received intermittent preventive treatment in the Democratic Republic of Congo.** *Malar J* 2018, **17**:17.
330. Swarthout TD, van den Broek IV, Kayembe G, Montgomery J, Pota H, Roper C: **Artesunate + amodiaquine and artesunate + sulphadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated malaria in Democratic Republic of Congo: a clinical trial with determination of sulphadoxine and pyrimethamine-resistant haplotypes.** *Trop Med Int Health* 2006, **11**:1503-1511.
331. Taylor SM, Antonia AL, Harrington WE, Goheen MM, Mwapasa V, Chaluluka E, Fried M, Kabyemela E, Madanitsa M, Khairallah C, et al: **Independent lineages**

- of highly sulfadoxine-resistant *Plasmodium falciparum* haplotypes, eastern Africa. *Emerg Infect Dis* 2014, **20**:1140-1148.
332. Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F, et al: **Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study.** *J Infect Dis* 2015, **211**:680-688.
 333. Wilson PE, Kazadi W, Kamwendo DD, Mwapasa V, Purfield A, Meshnick SR: **Prevalence of pfcrt mutations in Congolese and Malawian *Plasmodium falciparum* isolates as determined by a new Taqman assay.** *Acta Trop* 2005, **93**:97-106.
 334. Bonnet M, van den Broek I, van Herp M, Urrutia PPP, van Overmeir C, Kyomuhendo J, Ndosimao CN, Ashley E, Guthmann J-P: **Varying efficacy of artesunate+ amodiaquine and artesunate+ sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo: a report of two in-vivo studies.** *Malaria Journal* 2009, **8**:1-9.
 335. Mavoko HM, Nabasumba C, da Luz RI, Tinto H, D'Alessandro U, Kambugu A, Baraka V, Rosanas-Urgell A, Lutumba P: **Efficacy and safety of re-treatment with the same artemisinin-based combination treatment (ACT) compared with an alternative ACT and quinine plus clindamycin after failure of first-line recommended ACT (QUINACT): a bicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial.** *The Lancet Global Health* 2017, **5**:e60-e68.
 336. Gargano N, Madrid L, Valentini G, D'Alessandro U, Halidou T, Sirima S, Tshetu A, Mtoro A, Gesase S, Group EDS: **Efficacy and tolerability outcomes of a phase II, randomized, open-label, multicenter study of a new water-dispersible pediatric formulation of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated plasmodium falciparum malaria in African infants.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2018, **62**:e00596-00517.
 337. Macintyre F, Adoke Y, Tiono AB, Duong TT, Mombo-Ngoma G, Bouyou-Akotet M, Tinto H, Bassat Q, Issifou S, Adamy M: **A randomised, double-blind clinical phase II trial of the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose combination treatment with artefenomel and piperaquine in adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria.** *BMC medicine* 2017, **15**:1-19.
 338. Matangila JR, Doua JY, Mitashi P, da Luz RI, Lutumba P, Van Geertruyden JP: **Efficacy and safety of intermittent preventive treatment in schoolchildren with sulfadoxine/pyrimethamine (SP) and SP plus piperaquine in Democratic Republic of the Congo: a randomised controlled trial.** *International journal of antimicrobial agents* 2017, **49**:339-347.
 339. Kazadi WM, Vong S, Makina BN, Mantshumba JC, Kabuya W, Kebela BI, Ngimbi NP: **Assessing the efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Democratic Republic of Congo.** *Tropical Medicine & International Health* 2003, **8**:868-875.
 340. Espié E, Lima A, Atua B, Dhorda M, Flévaud L, Sompwe EM, Urrutia PPP, Guerin PJ: **Efficacy of fixed-dose combination artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine for uncomplicated childhood *Plasmodium***

- falciparum malaria in Democratic Republic of Congo: a randomized non-inferiority trial.** *Malaria journal* 2012, **11**:1-9.
341. van der Pluijm RW, Tripura R, Hoglund RM, Phyto AP, Lek D, Ul Islam A, Anvikar AR, Satpathi P, Satpathi S, Behera PK: **Triple artemisinin-based combination therapies versus artemisinin-based combination therapies for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a multicentre, open-label, randomised clinical trial.** *The Lancet* 2020, **395**:1345-1360.
 342. Tshefu AK, Gaye O, Kayentao K, Thompson R, Bhatt KM, Sesay SS, Bustos DG, Tjitra E, Bedu-Addo G, Borghini-Fuhrer I: **Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in children and adults with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: a randomised non-inferiority trial.** *The Lancet* 2010, **375**:1457-1467.
 343. Labama Otuli N, Marini Djang'eing'a R, Losimba Likwela J, Bosenge Nguma JD, Maindo Alongo MA, Ahuka Ona Longombe A, Mbutu Mango B, Mn Bono D, L. Mokili J, Manga Okenge JP: **Efficacy and safety of malarial prophylaxis with mefloquine during pregnancy in Kisangani, Democratic Republic of Congo: A randomized clinical trial.** *British Journal of Clinical Pharmacology* 2021.
 344. Onyamboko M, Fanello C, Wongsan K, Tarning J, Cheah P, Tshefu K, Dondorp A, Nosten F, White N, Day N: **Randomized comparison of the efficacies and tolerabilities of three artemisinin-based combination treatments for children with acute Plasmodium falciparum malaria in the Democratic Republic of the Congo.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014, **58**:5528-5536.
 345. Toure OA, Mwapasa V, Sagara I, Gaye O, Thompson R, Maheshwar AV, Mishra P, Behra N, Tshefu AK, Das RR: **Assessment of Efficacy and Safety of Arterolane Maleate-Piperaquine Phosphate Dispersible Tablets in Comparison With Artemether-Lumefantrine Dispersible Tablets in Pediatric Patients With Acute Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria: A Phase 3, Randomized, Multicenter Trial in India and Africa.** *Clinical Infectious Diseases* 2017, **65**:1711-1720.
 346. Sinou V, Maladca LTM, Taudon N, Lwango R, Alegre SS, Aux LB, Sugnaux F, Parzy D, Benakis A: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new ACT formulation: Artesunate/Amodiaquine (TRIMALACT®) following oral administration in African malaria patients.** *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 2009, **34**:133-142.
 347. Tona Lutete G, Mombo-Ngoma G, Assi S-B, Bigoga JD, Koukouikila-Koussounda F, Ntamabyaliro NY, Ntoumi F, Agnandji ST, Groger M, Shin J: **Pyronaridine-artesunate real-world safety, tolerability, and effectiveness in malaria patients in 5 African countries: A single-arm, open-label, cohort event monitoring study.** *PLoS medicine* 2021, **18**:e1003669.
 348. Toure OA, Valecha N, Tshefu AK, Thompson R, Krudsood S, Gaye O, Rao BHK, Sagara I, Bose TK, Mohanty S: **A phase 3, double-blind, randomized study of arterolane maleate-piperaquine phosphate vs artemether-lumefantrine for falciparum malaria in adolescent and adult patients in Asia and Africa.** *Clinical Infectious Diseases* 2016, **62**:964-971.

ANNEXES

Données supplémentaires des études

Chapitre 4

- Figure S4.1.** Carte géographique des sites échantillonnés pour l'analyse du polymorphisme du gène *P. falciparum* kelch13 (*PfK13*) en Afrique
- Figure S4.2.** Cartes géographiques des sites enregistrant des isolats avec des mutations K189T et A578S
- Figure S4.3.** Carte géographique des sites enregistrant des mutations imitant les marqueurs *PfART-R* en Afrique
- Figure S4.4.** Carte géographique interactive des marqueurs *PfART-R* signalés en Afrique

Chapitre 5

- Tableau S5.1.** Caractéristiques de base des articles inclus dans la revue
- Figure S5.1.** Cartographie des sites de collecte d'échantillons étudiés dans cette revue
- Figure S5.2.** Distribution des mutations du *PfMDR1* en RDC
- Figure S5.3.** Fréquence et distribution géographique des parasites du *Plasmodium* porteurs des mutations non-synonymes du *PfK13* en RDC

Chapitre 6

- Tableau S6.1.** Séquences d'amorces et conditions de réaction PCR utilisées pour la détection des mutations de la DHFR (N51C, C59R et S108N) et de la DHPS (A437G et K540E)
- Tableau S6.2.** Prévalence du paludisme chez les parturientes

Chapitre 8

- Tableau S8.1.** Liste des TET conduits en RDC
- Tableau S8.2.** Les outils MECAT (*Monitoring and Evaluation Capacity Assessment Toolkit*) et approches méthodologiques utilisés
- Liste S8.1.** Documents réunis lors de la fouille documentaire

Annexe au Chapitre 4

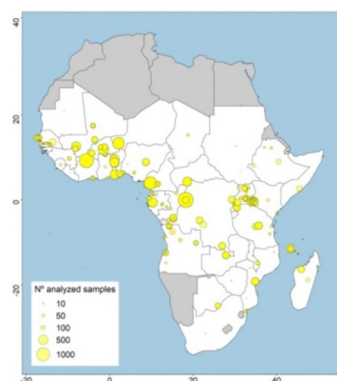


Figure S4.1. Carte géographique des sites échantillonnés pour l'analyse du polymorphisme du gène *Plasmodium falciparum* kelch13 (*PfK13*) en Afrique.

L'emplacement de chaque enquête a été géoréférencé et téléchargé sur cette carte. Les pays non ombrés représentent les régions étudiées tandis que les pays ombrés sont les zones pour lesquelles aucune étude sur *PfK13* n'a été trouvée au cours de cette revue. Les cercles jaunes représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel à la taille de l'échantillon séquençé avec succès pour le gène *PfK13*.

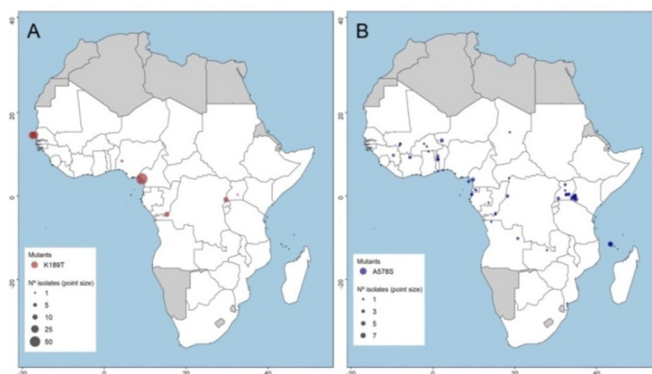


Figure S4.2. Cartes géographiques des sites enregistrant des isolats avec des mutations K189T et A578S.

Ces cartes représentent le nombre d'isolats porteurs des mutations K189T (A) et A578S (B) qui ont été enregistrés dans différents sites d'échantillonnage. Parmi toutes les mutations trouvées dans la revue, les allèles K189T et A578S étaient les plus fréquemment rapportés dans les études qui séquençaient respectivement l'ensemble du gène *PfK13* et le domaine de l'hélice *PfK13*. Les cercles représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel au nombre d'isolats trouvés avec K189T ou A578S dans le gène *PfK13*.

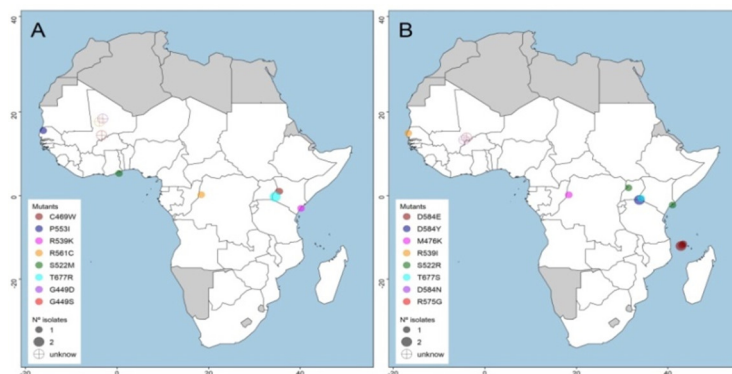


Figure S4.3. Carte géographique des sites enregistrant des mutations imitant les marqueurs *PfART-R* en Afrique.

Un ensemble de seize allèles structurellement similaires aux mutations répertoriées par l'OMS en tant que marqueurs *PfART-R* a été décrit. Cette carte montre la distribution spatiale des isolats portant ces allèles (représentés par différentes couleurs). Les cercles représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel au nombre d'isolats trouvés avec chacune de ces mutations imitant les marqueurs *PfART-R*. Les enquêtes dans lesquelles le nombre d'isolats portant un allèle donné n'a pas été trouvé sont représentées par des cercles barrés.



Figure S4.4. Carte géographique interactive des marqueurs *PfART-R* signalés en Afrique.

Nous fournissons une carte interactive affichant tous les marqueurs *PfART-R* découverts en Afrique jusqu'au 30 décembre 2018 (accessible sur <http://www.cbira.be>).

Annexes au Chapitre 5

Tableau S5.1. Caractéristiques de base des articles inclus dans la revue

Article	Période de collecte	n	Marqueur moléculaire	Nbre de sites
(Alker et al., 2008) [252]	2002	249	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	1
(Antonia et al., 2014) [322]	2007	180	<i>Pf</i> crt	Inconnu
(Ashley et al., 2014) [15]	2011, 2012, 2013, 2014, 2016	NA	<i>Pf</i> K13	1
(Baraka et al., 2018) [226]	2012-2014	2265	<i>Pf</i> mdr1	1
(Baraka et al., 2017) [236]	2012-2014	37	<i>Pf</i> dhps	1
(Cohuet et al., 2006) [323]	2003–2004	458	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	3
(Deutsch-Feldman et al., 2019) [324]	2013-2014, 2007	852	<i>Pf</i> dhps, <i>Pf</i> crt	Inconnu
(Kamau et al., 2015) [325]	2013-2014	82	<i>Pf</i> K13	1
(van Lenthe et al., 2019) [326]	2017	1086	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	4
(Leroy et al., 2019) [216]	2014-2015	5	<i>Pf</i> K13	1
(Mandoko et al., 2018) [237]	2014-2015	2030	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	2
(Ménard et al., 2016) [78]	2009-2014	1288	<i>Pf</i> K13	4
(Mens et al., 2008) [327]	2003-2004	78	dhps	1
(Miotto et al., 2015) [171]	2009-2010	115	<i>Pf</i> K13	1
(Mobula et al., 2009) [217]	2008	142	<i>Pf</i> crt, <i>Pf</i> mdr1, <i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	1
(Mvumbi et al., 2017) [6]	2014	280	<i>Pf</i> K13	6
(Mvumbi et al., 2013) [328]	2010	145	<i>Pf</i> crt	1
(Ruh et al., 2018) [329]	2014	48	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	1
(Swarthout et al., 2006) [330]	2003	217	<i>Pf</i> dhfr, <i>Pf</i> dhps	1
(Taylor et al., 2014) [331]	2007	179	<i>Pf</i> dhps	11
(Taylor et al., 2015) [332]	2007	151	<i>Pf</i> K13	3
(Wilson et al., 2005) [333]	2002	56	<i>Pf</i> crt	1
(Yobi et al., 2020b) [205]	2017	1070	<i>Pf</i> crt	10
(Yobi et al., 2020a) [311]	2017	1070	K13	10
(Yobi et al., 2021)	2018-2019	474	<i>Pf</i> crt, <i>Pf</i> k13, <i>Pf</i> mdr1	6
(Yobi et al. 2021)	2019-2020	1087	<i>Pf</i> crt, <i>Pf</i> k13	10
(Kayiba et al., 2021) [207]	2018-2019	844	<i>Pf</i> dhps, <i>Pf</i> dhfr	1

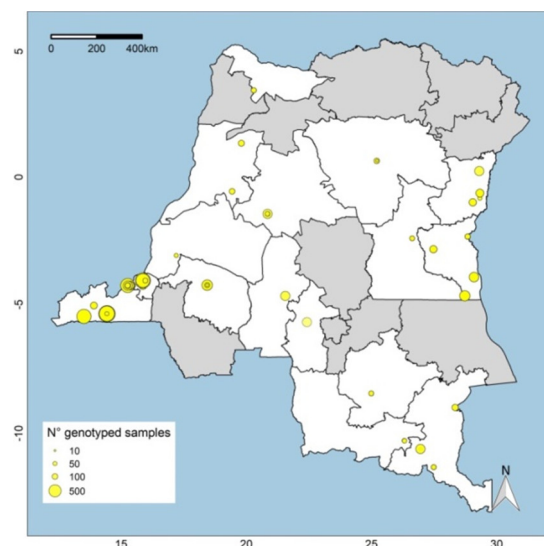


Figure S5.1. Cartographie des sites de collecte d'échantillons étudiés dans cette revue. L'emplacement de chaque enquête a été géo-référencé et projeté sur cette carte. Les aires non ombrées représentent les régions étudiées tandis que les régions ombrées sont les zones pour lesquelles aucune étude correspondante n'a été trouvée au cours de cette revue. Les cercles jaunes représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel à la taille de l'échantillon séquencé avec succès pour un gène de résistance aux antipaludiques.

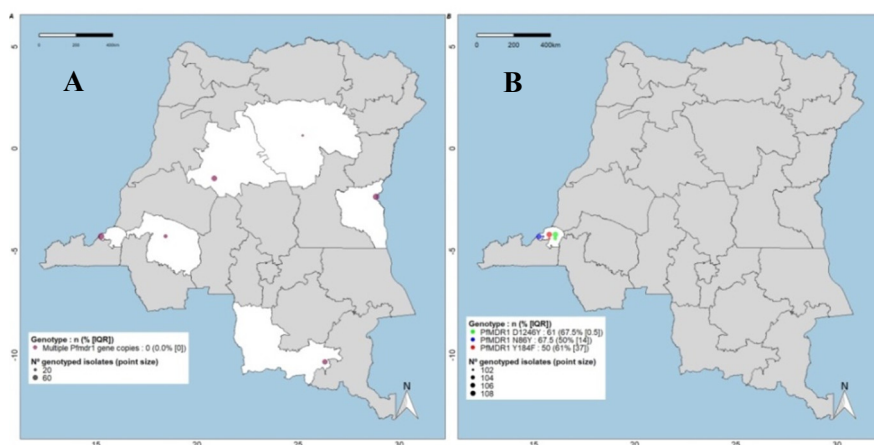


Figure S5.2. Distribution des mutations du *PfMDR1* en RDC.

Chaque enquête ayant recherché une altération donnée de la séquence de *PfMDR1* a été géo-référencée et projetée sur ces deux cartes. Sur la carte A, l'altération est une amplification du gène *Pfmdr1* et sur la carte B, des mutations NS. Les aires non ombrées représentent les provinces où des enquêtes ont été conduites et celles ombrées, les

provinces où aucune enquête n'a été conduite. Les cercles représentent des enquêtes menées à différents endroits avec un diamètre proportionnel à la taille de l'échantillon d'isolats ayant été analysés avec succès pour l'altération correspondante. Les couleurs différencient les différents types d'altérations de la séquence de *PfMDR1* recherchés et pour lesquels les fréquences médianes et les intervalles interquartiles respectifs sont présentés.

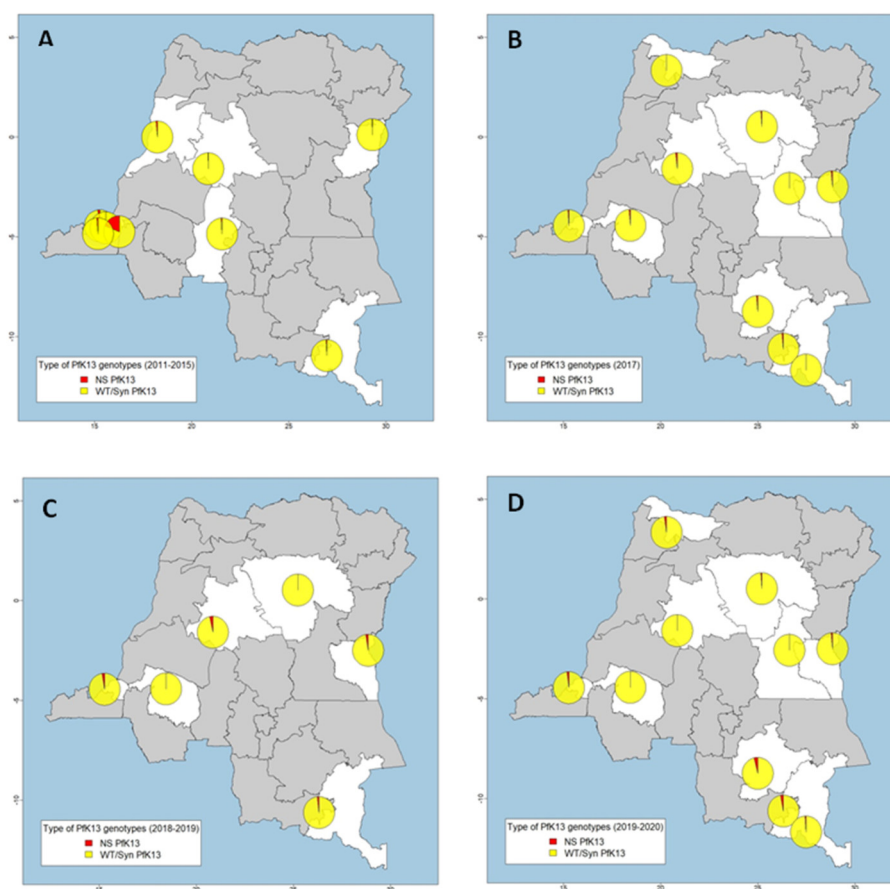


Figure S5.3. Fréquence et distribution géographique des parasites du *Plasmodium* porteurs des mutations non-synonymes du *PfK13* en RDC.

Les camemberts affichés sur ces cartes représentent les proportions d'isolats arborant au moins une mutation non-synonyme du *PfK13* (NS, portion de couleur rouge) et celles d'isolats porteur d'une séquence du *PfK13* de type sauvage ou comportant uniquement des mutations synonymes (WT/Syn, portion en jaune). Les données ont été éclatées et aérées en suivant différentes périodes de collecte des échantillons.

Annexes au Chapitre 6

Tableau S6.1. Séquences d'amorces et conditions de réaction PCR utilisées pour la détection des mutations de la DHFR (N51C, C59R et S108N) et de la DHPS (A437G et K540E)

Type de PCR, gène et amorce	Taille de l'amplicon (bp)	Séquences des amorces (5'-3')	Conditions de PCR
1 ^{ème} PCR			
A1	720	TTTATATTTTCTCCTTTT	94°C x 3 min ; 45 x [94°C 30 sec ; 50°C 45 sec ; 72°C 45 sec] ; 72°C 10 min
Dhfr A2		CATTTTATTATTCGTTTCT	
PCRs nichées			
A3	522	GTCTGCGACGTTTTCGATATTTATGC	94°C 3 min ; 45 x [94°C 30 sec ; 45°C 45 sec ; 72°C 45 sec] ; 72°C 10 min
dhfr F1		AAATTCCTTGATAAACAACGGAACCTTTT	
F		GAAATGTAATTCCTAGATATGGAATATT	
Dhfr M4	326	TAAATTTCCCAAGTAAACTATTAGAGCTTC	94°C 3 min ; 45 x [94°C 30 sec ; 45°C 45 sec ; 72°C 45 sec] ; 72°C 10 min
1 ^{ème} PCR			
R1	711	AACCTAAACGTGCTGTTC	94°C 3 min ; 45 x [94°C 30 sec ; 50°C 1 min ; 72°C 1 min] ; 72°C 10 min
dhps R2		AATTGTGTGATTGTCCACAA	
PCR nichée			
K	438	TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC	94°C 3 min ; 45 x [94°C 30 sec ; 45°C 1min ; 72°C 1 min] ; 72°C 10 min
dhps K1		CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA	

Tableau S6.2. Prévalence du paludisme chez les parturientes

Test de paludisme		Goutte épaisse				Total		Kappa	p-value
		Positive		Négative					
		n	%	n	%	N	%		
TDR	Positif	22	29,3	53	70,7	75	100,0	0.35	<0.001
	Négatif	16	2,1	753	97,9	769	100,0		
Total		38	4,5	806	95,5	844	100,0		

(*) Total des échantillons positifs : 91 (10.8%)

Annexes au Chapitre 8

Tableau S8.1. Liste des TET conduits en RDC

Article	Période de collecte	Site de collecte	Médicaments évalués (Taux d'échecs global)
(de Wit et al., 2016) [229]	2013- 2014	Baraka, South Kivu	AS-AQ (22 %), A-L (16 %)
(Bonnet et al., 2009) [334]	2003-2004	Boende	AS+S-P (24,6 %), AS-AQ (15,1 %), S-P (35,9 %), AQ (18,3 %)
		Kabalo	AS+S-P (0%), AS-AQ (0%), S-P (19,6 %)
(Mavoko et al., 2017) [335]	2012-2014	Kinshasa RDC et Ouganda	ACTr (8,6 %), ACTa (8,7 %), QNc (10,5%)
(Gargano et al., 2018) [336]	2013-2015	RDC et ailleurs	DHA-PIP dispersible (2,7-13.1%), DHA-PIP écrasé (0-15.1%)
(Macintyre et al., 2017) [337]	2014-2015	Kinshasa	AF-PIP (26,5%)
(Muhindo Mavoko et al., 2016) [230]	2012-2014	Kinshasa	AS-AQ (7,2-44, 7%)
(Matangila et al., 2017) [338]	2017	Kinshasa	S-P (32%), S-P/PIP (17%)
(Onyamboko et al., 2020) [231]	2013-2014	Kinshasa	AS-AQ (26,7%), A-L (29,8%), DHA/PIP (15,7%)
(Kazadi et al., 2003) [339]	2004	Kinshasa, Mikalayi, Kapolowe, Vanga, Kimpese, Kisangani, Bukavu	CQ (44,4%), S-P (7,5%)
		Katanga	AS-AQ (1,7 %), A-L (0,9 %)
(Espié et al., 2012) [340]	2008-2009	RDC et ailleurs	A-L (3%), A-L/AQ (2 %)
(van der Pluijm et al., 2020) [341]	2015-2018	RDC et ailleurs	Pyr/AS (0,8 %), A-L (0,5 %)
(Tshefu et al., 2010) [342]	2007-2008	Kisangani	S-P (16,3-18,9%), MQ (7,1-8,3%)
(Labama Otuli et al., 2021) [343]	2019	Kinshasa	DHA-PIP (13,7%), ASAQ (27,0%), A-L (29,8%)
(Onyamboko et al., 2014) [344]	2011-2012		AM/PIP (0-4,0 %), A-L (1,5-4,2%)
(Toure et al., 2017) [345]	2017		AS-AQf (0%)
(Sinou et al., 2009) [346]	2009	RDC	
(Tona Lutete et al., 2021) [347]	2017- 2019	RDC et ailleurs	Pyr/AS (1,4 %)
(Toure et al., 2016) [348]	NA	RDC et ailleurs	AM/PIP (0,7-7,2%), A-L (0,9-7,5%)

Tableau S8.2. Les outils MECAT (*Monitoring and Evaluation Capacity Assessment Toolkit*) et approches méthodologiques utilisés

Outil	Méthode	Cible	Questions principales posées
Guide d'observation des activités	Observation participative	Activités antipaludiques tenues sur les sites sentinelles	• Quels sont les objectifs et les attentes de l'organisation en matière de résistance aux antipaludiques ?
Guide de revue documentaire	Examen approfondi et fouille documentaire	Documents organisationnels, registres ou bases des données	• Quel est l'état des lieux des activités de surveillance épidémiologique des résistances aux antipaludiques en RDC ? • Quels sont les ressources et capacités disponibles pour assurer la surveillance des résistances aux antipaludiques ?
Guide des entretiens	Entrevues avec les Informateurs clés	PNLP et organisation prenant part aux activités de surveillance	• Quelles sont les performances de l'organisation par rapport à ses objectifs et aux attentes en matière de la surveillance des résistances aux antipaludiques ? • Quelles sont les atouts, forces, opportunités et menaces pour la réalisation des activités de surveillance des résistances aux antipaludiques ?

Liste 8.1. Documents réunis lors de la fouille documentaire**1) Documents du PNL**

Rapports annuels d'activités de lutte contre le paludisme PNL 2020, 2018, 2016, 2013

Plan Stratégique National de lutte contre le paludisme 2002-2006 ; 2007-2011 ; 2013-2015, 2017-2020 ; 2020-2023

Directive de prise en charge du paludisme PNL 2017, 2021

Bases des données épidémiologiques du PNL

2) Documents du PRD/PALU-UNIKIN

Projet PRD Palu/ARES

Rapports annuels des activités 2017, 2018, 2019 et 2020

Compte Rendus des Enquêtes de terrain

Rapport des Séjours doctoraux 2017, 2018, 2019 et 2020

Compte Rendus des Réunions de coordination du LBMFM

Articles publiés :

- Yobi, D.M., Kayiba, N.K., Mvumbi, D.M. *et al.* Molecular surveillance of anti-malarial drug resistance in Democratic Republic of Congo: high variability of chloroquinoreistance and lack of amodiaquinoreistance. *Malar J* **19**, 121 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03192-x>
- Yobi DM, Kayiba NK, Mvumbi DM, Boreux R, Bontems S, Kabututu PZ, et al. (2020) The lack of K13-propeller mutations associated with artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Democratic Republic of Congo (DRC). *PLoS ONE* 15(8): e0237791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237791>
- Yobi, D.M., Kayiba, N.K., Mvumbi, D.M. *et al.* Assessment of *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug resistance markers in *Pfk13*-propeller, *Pfprt* and *Pfmdr1* genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018–2019. *Malar J* **20**, 144 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03636-y>
- Kayiba, N.K., Yobi, D.M., Devleeschauwer, B. *et al.* Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo. *Malar J* **20**, 260 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03789-w>
- Kayiba, N.K., Yobi, D.M., Tchakounang V.R.K., et al. Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kingasani Hospital, Kinshasa in the Democratic Republic of Congo. *Infection, Genetics and Evolution* 94 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105009>

3) Stratégie de recherche des documents sur PubMed et Embase : Les enquêtes des marqueurs moléculaires de la résistance en RDC (tableau 5.1)

- #1 (malaria OR paludisme OR *Plasmodium*)
("molecular marker" OR "marqueur moléculaire" OR *mdr1* OR *Pfmdr1* OR *Pfmdr2* OR *crt* OR *Pfprt* OR *kelch13* OR *Pfkelch13* OR
- #2 K13 OR *dhfr* OR *Pfdhfr* OR *dhps* OR *Pfdhps* OR *Pfpm3* OR *Pfpm2* OR *Pfcytb* OR *Pfnhe1*) AND (resistance OR résistance)
- #3 ("Democratic Republic of Congo" OR Zaire OR Congo)

Search #1 AND #2 AND #3

4) Stratégie de recherche des documents sur PubMed et Embase : Les TET réalisés en RDC (tableau 8.1)

- #1 (malaria OR paludisme OR *Plasmodium*)
 #2 (“treatment efficacy” OR “clinical trial” OR “drug efficacy” OR trial)
 #3 (“Democratic Republic of Congo” OR Zaire OR Congo)
 Search #1 AND #2 AND #3

Publications scientifiques

Publications principales de ce travail

1. **Kayiba NK**, Yobi DM, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Yamaoka Y, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Okitolonda Wemakoy E, De Mol P, Mvumbi GL, Hayette MP, Rosas-Aguirre A, Speybroeck N. Spatial and molecular mapping of *Pfkelch13* gene polymorphism in Africa in the era of emerging *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin: a systematic review. (Publié : *Lancet Infect Dis.* 2021 Apr;21(4):e82-e92. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30493-X. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33125913)
2. **Kayiba NK**, Yobi DM, Kouoneyou VRT, Mvumbi DM, Kabututu ZP, Devleesschauwer B, Sompwe EM, De Mol P, Hayette MP, Mvumbi GL, Rosas-Aguirre A, Dikassa PL, and Speybroeck N. Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul 18;94:105009.
3. **Kayiba NK**, Yobi DM, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Kabututu ZP, Likwela JL, Kalindula L, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL, Dikassa PL, Beutels P, Rosas-Aguirre A, and Speybroeck N. Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2021 Jun 9;20(1):260.
4. **Kayiba NK**, Yobi DM, Mvumbi DM, Devleesschauwer B, Kabututu ZP, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL, Rosas-Aguirre A, Dikassa PL, and

Speybroeck N. Assessment of the feasibility of the epidemiological surveillance of resistance to antimalarial drugs in the DR Congo: Role, advantages, and challenges for integrating molecular markers in the national antimalarial policy (Article sous presse)

5. **Kayiba NK**, Rosas-Aguirre A, Tshibangu-kabamba E, Kaku N, Kaneko A, Kido Y, Mvumbi DM., Yobi MD, Devleesschauwer B, Kabututu ZP, De Mol P, Mvumbi GL, Hayette MP, Dikassa PL, Speybroeck S. Paul Lusamba Dikassa, Niko Speybroeck. Spatial-temporal mapping for the surveillance of antimalarial drug resistance in the Democratic Republic of Congo: Evidence from a Living Systematic Review (Article sous presse)

Publications connexes à ce travail

6. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Bontems S, Kabututu PZ, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. The lack of K13-propeller mutations associated with artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Democratic Republic of Congo (DRC). PLoS One. 2020 Aug 21;15(8):e0237791. doi: 10.1371/journal.pone.0237791. PMID: 32822392; PMCID: PMC7446852
7. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Likwela JL, De Mol P, Okitolonda EW, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. Molecular surveillance of anti-malarial drug resistance in Democratic Republic of Congo: high variability of chloroquinoresistance and lack of amodiaquinoresistance. Malar J. 2020 Mar 20;19(1):121. doi: 10.1186/s12936-020-03192-x. PMID: 32197607; PMCID: PMC7085146
8. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Umesumbu SE, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. Assessment of *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug resistance markers in *Pfk13*-propeller, *Pfprt* and *Pfmdr1* genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018-2019. Malar J. 2021 Mar 11;20(1):144. doi: 10.1186/s12936-021-03636-y. PMID: 33706773; PMCID: PMC7953712

Autres publications

9. Tshibangu-Kabamba E, Phuc BH, Vo Phuoc Tuan, Fauzia KA, Kabongo-Tshibaka A, **Kayiba NK**, Rosas-Aguirre A, Devleesschauwer B, Cimuanga-Mukanya A, Kisoko PJN, Matsumoto T, Akada J, Tumba GD, Ngoyi DM, Kido Y, Speybroeck N, and Yamaoka Y. Assessment of the diagnostic accuracy and relevance of a novel ELISA system developed for seroepidemiologic surveys of *Helicobacter pylori* infection in African settings. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2021, vol. 15, no 9, p. e0009763.
10. **Kayiba NK**, Tshibangu KE, Nsenda NJ et Disashi TG. Evaluation de la thérapeutique transfusionnelle au cours de l'anémie palustre sévère à Mbuji-Mayi, RD Congo. *Revue Médicale de Grands Lacs*, n°6 (1), 2014, pp. 29-34

Communications scientifiques

1. **Malaria in Melbourne Conference 2021** (28–29 October 2021, Melbourne, Australia)
 Présentation orale: “Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kingasani Hospital, Kinshasa in the Democratic Republic of Congo”
2. **Journée internationale de lutte contre le paludisme 2021** (JIP 2021, Kinshasa, RD congo)
 Présentation orale : “La résistance du *Plasmodium Falciparum* aux antipaludiques en RDC : ensemble luttons contre l’émergence et la propagation des résistances”
3. **Xième Congrès International de Pathologie Infectieuse et Parasitaire** (CIPIP X 2019, Kinshasa, RD congo)
 Présentation orale : Characterization of the treatment trajectory and assessment of the disease weight during uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo
4. **Congrès international de la Société Européenne de Médecine Tropicale et Santé Internationale** (ECTMIH 2019, Liverpool, Angleterre)
 Présentation orale : Spatial and molecular mapping of the *PfKelch13* gene polymorphism in Africa in the era of emerging *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin: A systematic review
5. **Ecole doctorale Thématique biologie cellulaire - moléculaire et biochimie** (Interuniversity PhD Student Day 2019, Bruxelles, Belgique)
 Poster: The emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin and derivative drugs in Africa: A systematic review
6. **Les séminaires doctoraux, Institut de recherche santé et société** (2018, Bruxelles, Belgique)
 Présentation orale : Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P.falciparum* à la sulfadoxine-pyrimethamine chez les femmes enceintes à Kinshasa, en République Démocratique du Congo

CURRICULUM VITAE

Nadine Kayiba Kalenda est un médecin spécialiste en santé publique qui jouit d'une bonne expérience dans la gestion des projets de lutte contre les maladies infectieuses et parasitaires en République Démocratique du Congo. Sa carrière professionnelle combine des pratiques épidémiologiques ainsi que des activités d'enseignement et de recherche. Elle a fait de la lutte contre le paludisme son cheval de bataille ces 5 dernières années. Ses recherches actuelles visent à renforcer la lutte contre le paludisme pharmaco-résistant en République Démocratique du Congo et dans le monde, par un programme de surveillance épidémiologique basé sur la détection des marqueurs moléculaires de résistance afin de réduire la morbi-mortalité et alléger le poids socio-économique du paludisme.

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

Activités en milieu académique et scientifique

**2017 à ce jour : Doctorante, Institut de Recherche en Santé et Société (IRSS),
Faculté de Santé Publique, Université catholique de Louvain,
Bruxelles, Belgique**

Exécution du Projet ARES/PALU-UNIKIN de Mise en place d'un système national de surveillance des marqueurs moléculaires de la résistance aux antipaludiques en RDC 2017 à ce jour

**Chef des travaux, Santé Publique, Faculté de Médecine,
Université de Mbuji-Mayi, RDC**

Enseignement des étudiants en Médecine

Recherche

**2012 -2016 : Assistante de recherche en Santé Publique, Faculté de Médecine,
Université de Mbuji-Mayi, RDC**

Enseignement et encadrement pratique des étudiants en Médecine

Recherche

2010 à ce jour : Membre, American Society for Microbiology (ASM), USA

Activités en milieu médical

2018 à ce jour : Médecin épidémiologiste, Programme National de Réadaptation à base Communautaire, Ministère de la Santé, Kinshasa, RDC

Surveillance épidémiologique des cas de pied-bot dans la communauté

Réintégration communautaire des personnes vivant avec handicap

2013 à 2018 : Médecin Superviseur, Zone de Santé de Kasele, Mbuji-Mayi, RDC

Gestion et Surveillance Epidémiologique des maladies

Gestion du Système National d'Information Sanitaire (SNIS) de la Zone de Santé

2010 à 2012 : Médecin Traitant, Hôpital Valentin Disashi à Mbuji-Mayi, RDC

Prise en charge médicale et suivi des patients en médecine générale

Activités bénévoles

2019 à ce jour : Médecin Chef du Département de Santé Publique, Fondation Aurore, Kinshasa, RDC

Rédaction et gestion des projets de lutte contre les cancers digestifs

2017 à ce jour : Présidente du Conseil d'Administration, ONG Easy Way, RDC

Direction, organisation stratégique et de gestion des ressources

Démarches partenariales

Gestion des projets de lutte contre la malnutrition en RDC

2016 à ce jour : Consultante, Bureau d'Expertise en Santé Publique (BEST), Bruxelles, Belgique

Evaluation, audits d'organisation et analyse stratégique de divers projets en santé

Prix

Prix d'Excellence Rawji pour la Meilleure finaliste de la Faculté de Médecine à Université de Mbuji-Mayi, Edition 2010, délivré par la Fondation Rawji, Kinshasa, RDC

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Articles scientifiques

1. **Kayiba NK**, Yobi DM, Mvumbi DM, Devleesschauwer B, Kabututu ZP, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL, Rosas-Aguirre A, Dikassa PL, and Speybroeck N. Assessment of the feasibility of the epidemiological surveillance of resistance to antimalarial drugs in the DR Congo: Role, advantages, and challenges for integrating molecular markers in the national antimalarial policy (Article sous presse)
2. **Kayiba NK**, Rosas-Aguirre A, Tshibangu-kabamba E, Kaku N, Kaneko A, Kido Y, Mvumbi DM., Yobi MD, Devleesschauwer B, Kabututu ZP, De Mol P, Mvumbi GL, Hayette MP, Dikassa PL, Speybroeck S. Paul Lusamba Dikassa, Niko Speybroeck. Spatial-temporal mapping for the surveillance of antimalarial drug resistance in the Democratic Republic of Congo: Evidence from a Living Systematic Review (Article sous presse)
3. **Kayiba NK**, Yobi DM, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Yamaoka Y, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Okitolonda Wemakoy E, De Mol P, Mvumbi GL, Hayette MP, Rosas-Aguirre A, Speybroeck N. Spatial and molecular mapping of *Pfkelch13* gene polymorphism in Africa in the era of emerging *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin: a systematic review. (Publié : *Lancet Infect Dis.* 2021 Apr;21(4):e82-e92. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30493-X. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33125913)
4. **Kayiba NK**, Yobi DM, Kouoneyou VRT, Mvumbi DM, Kabututu ZP, Devleesschauwer B, Sompwe EM, De Mol P, Hayette MP, Mvumbi GL, Rosas-Aguirre A, Dikassa PL, and Speybroeck N. Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul 18;94:105009.
5. **Kayiba NK**, Yobi DM, Devleesschauwer B, Mvumbi DM, Kabututu ZP, Likwela JL, Kalindula L, DeMol P, Hayette M-P, Mvumbi GL, Dikassa PL, Beutels P, Rosas-Aguirre A, and Speybroeck N. Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2021 Jun 9;20(1):260.

6. Tshibangu-Kabamba E, Phuc BH, Vo Phuoc Tuan, Fauzia KA, Kabongo-Tshibaka A, **Kayiba NK**, Rosas-Aguirre A, Devleesschauwer B, Cimuanga-Mukanya A, Kisoko PJN, Matsumoto T, Akada J, Tumba GD, Ngoyi DM, Kido Y, Speybroeck N, and Yamaoka Y. Assessment of the diagnostic accuracy and relevance of a novel ELISA system developed for seroepidemiologic surveys of *Helicobacter pylori* infection in African settings. PLoS neglected tropical diseases, 2021, vol. 15, no 9, p. e0009763.
7. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Bontems S, Kabututu PZ, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. The lack of K13-propeller mutations associated with artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Democratic Republic of Congo (DRC). PLoS One. 2020 Aug 21;15(8):e0237791. doi: 10.1371/journal.pone.0237791. PMID: 32822392; PMCID: PMC7446852
8. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Likwela JL, De Mol P, Okitolonda EW, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. Molecular surveillance of anti-malarial drug resistance in Democratic Republic of Congo: high variability of chloroquinoreistance and lack of amodiaquinoreistance. Malar J. 2020 Mar 20;19(1):121. doi: 10.1186/s12936-020-03192-x. PMID: 32197607; PMCID: PMC7085146
9. Yobi DM, **Kayiba NK**, Mvumbi DM, Boreux R, Kabututu PZ, Situakibanza HNT, Umesumbu SE, De Mol P, Speybroeck N, Mvumbi GL, Hayette MP. Assessment of *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug resistance markers in *Pfk13*-propeller, *Pfcrt* and *Pfmdr1* genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018-2019. Malar J. 2021 Mar 11;20(1):144. doi: 10.1186/s12936-021-03636-y. PMID: 33706773; PMCID: PMC7953712
10. **Kayiba NK**, Tshibangu KE, Nsenda NJ et Disashi TG. Evaluation de la thérapeutique transfusionnelle au cours de l'anémie palustre sévère à Mbujimayi, RDC. *Revue Médicale de Grands Lacs*, n°6 (1), 2014, pp. 29-34

Communications scientifiques

1. **Malaria in Melbourne Conference 2021** (28–29 October 2021, Melbourne, Australia)
 Presentation orale : “Evaluation of the usefulness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine in a context with increased resistance of *Plasmodium falciparum* in Kingasani Hospital, Kinshasa in the Democratic Republic of Congo”

2. **Journée internationale de lutte contre le paludisme 2021** (JIP 2021, Kinshasa, RDC).
Présentation orale : “La résistance du *Plasmodium Falciparum* aux antipaludiques en RDC : ensemble luttons contre l’émergence et la propagation des résistances”
3. **Xième Congrès International de Pathologie Infectieuse et Parasitaire** (CIPIP X 2019, Kinshasa, RDC).
Présentation orale: “Characterization of the treatment trajectory and assessment of the disease weight during uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo”
4. **Congrès international de la Société Européenne de Médecine Tropicale et Santé Internationale** (ECTMIH 2019, Liverpool, Angleterre).
Présentation orale: “Spatial and molecular mapping of the *PfKelch13* gene polymorphism in Africa in the era of emerging *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin: A systematic review”
5. **Ecole doctorale Thématique biologie cellulaire - moléculaire et biochimie** (Interuniversity PhD Student Day 2019, Bruxelles, Belgique)
Poster: “The emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin and derivative drugs in Africa: A systematic review”
6. **Les séminaires doctoraux, Institut de recherche santé et société** (2018, Bruxelles, Belgique)
Présentation orale : “Prévalence des marqueurs moléculaires de la résistance de *P.Falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes à Kinshasa, en République Démocratique du Congo”
7. **6^{ème} Congrès International des Pathologies Infectieuses et Parasitaires** (6^{ème} CIPIP 2013, Kinshasa, RDC).
Présentation orale : “Evaluation de l’efficacité de la transfusion dans la correction du taux d’hémoglobine au cours de l’anémie palustre grave”.

