

# ETUDE DE LA RESISTANCE *IN VITRO* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX ANTIPALUDIQUES ET RELATION AVEC LA MUTATION *PFMDR1* N86Y A BOBO DIOULASSO AU BURKINA FASO

## STUDY ON THE *IN VITRO* RESISTANCE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* TO ANTIMALARIAL DRUGS COUPLED WITH *PFMDR1* MUTATION IN BOBO DIOULASSO, BURKINA FASO

Bamba S<sup>1</sup>, Tinto H<sup>2,3</sup>, Drabo M<sup>1,2</sup>, Sangaré I<sup>1</sup>, Zida A<sup>1</sup>, Gaye O<sup>4</sup>, Guiguemdé TR<sup>1,2</sup>

1. Institut supérieur des sciences de la santé (INSSA), Bobo Dioulasso/ Burkina Faso.
2. Centre Muraz, Laboratoire de Parasitologie- Entomologie, Bobo Dioulasso/ Burkina Faso.
3. Institut de recherche en sciences de la santé (IRSS), Bobo Dioulasso/ Burkina Faso.
4. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, UCAD, Dakar, Sénégal.

**Bamba S, Tinto H, Drabo M, Sangaré I, Zida A, Gaye O, Guiguemdé TR.** Etude de la résistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques et relation avec la mutation *Pfmdr1* N86Y à Bobo Dioulasso au Burkina Faso.

### Résumé

Introduction :Trois antipaludéens : la monodeséthylamodiaquine, la quinine et la dihydroartémisinine ont été étudiés *in vitro* sur des isolats de *Plasmodium falciparum* à Bobo-Dioulasso. Les objectifs étaient d'évaluer la résistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux trois antipaludiques étudiés et de déterminer la fréquence de la mutation *Pfmdr-1* N86Y associée à la résistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

Matériel et Méthode : Ont été inclus des patients qui ont présenté une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum* avec une parasitémie d'au moins 4000 GRP/mm<sup>3</sup> de sang. Un confetti et un prélèvement veineux sur anticoagulant (EDTA) ont été réalisés pour chaque patient inclus. Pour l'étude *in vitro*, la technique du microtest isotopique de Desjardins dans sa version complète a été utilisée. La technique de la double PCR a été utilisée pour l'étude de la mutation *Pfmdr-1* N86Y.

Résultats :Trois isolats sur 38, soit 7,9% ont été résistants à l'amodiaquine *in vitro*. Cependant, tous les isolats *in vitro* ont été sensibles à la quinine et à la dihydroartémisinine soit 100%. La dihydroartémisinine a montré une activité statistiquement supérieure à celles de la quinine et de la monodeséthylamodiaquine (( $P < 10^{-6}$ ). Aucune différence significative n'a été observée en comparant le couple Amodiaquine /Quinine ( $p = 0,9$ ), ces deux antipaludiques appartenant à la même classe chimique. Pour l'étude du marqueur de la résistance *Pfmdr-1* N86Y, la proportion des isolats sauvages a été plus représentative soit 71% (27/38) contre 29% (11/38) de mutants (pures et mixtes) ( $P < 0,05\%$ ). Tous les isolats résistants *in vitro* ont présenté la mutation *Pfmdr-1* N86Y.

Conclusion : La présente étude montre une bonne sensibilité des isolats à la quinine et à la dihydroartémisinine dans la région de Bobo. Le marqueur *Pfmdr-1* N86Y semble être impliqué dans la résistance *in vitro* à l'amodiaquine.

Mots clés: résistance *in vitro* -*Plasmodium falciparum* – antipaludiques mutation *Pfmdr1* -Bobo Dioulasso

**Bamba S, Tinto H, Drabo M, Sangaré I, Zida A, Gaye O, Guiguemdé TR.** Study on the *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs coupled with *Pfmdr1* mutation in Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

### Summary

Introduction: Three antimalarial drugs: amodiaquine, quinine and dihydroartemisinin were studied *in vitro* based on *Plasmodium falciparum* isolates in Bobo Dioulasso. The objectives were to assess the *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to three antimalarial drugs investigated and to determine the frequency of the *Pfmdr-1* N86Y mutation associated with *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum*.

Material and Methods: This study included patients who presented a monospecific *P. falciparum* infection, with a parasitaemia of at least 4000 GRP/mm<sup>3</sup> of blood. A confetti and a venous blood sampling with anticoagulant (EDTA) were made for each patient included. For the *in vitro* study, the full version of Desjardins's isotopic micro-test technique was used. The dual PCR technique was used to study the *Pfmdr-1* N86Y mutation.

Results: Three isolates out of 38, i.e. 7.9% were amodiaquine-*in vitro* resistant. However, all *in vitro* isolates were sensitive to quinine and dihydroartemisinin i.e. 100%. Dihydroartemisinin activity proved to be statistically superior to those of quinine and amodiaquine (( $P < 10^{-6}$ ). However, no significant difference was observed comparing the couple Amodiaquine / Quinine ( $P = 0.9$ ). These two antimalarial drugs belonging to the same chemical class that is to say, to that of the quinolines. For the study of *Pfmdr1* Y 86 resistance marker, the proportion of wild isolates were more representative i.e. 71% (27/38) against 29% (11/38) of mutants (pure and mixed) ( $P < 0.05\%$ ). All *in vitro* resistant isolates presented the *Pfmdr-1* N86Y mutation.

Conclusion: This study reveals a good sensitivity of isolates to quinine and dihydroartemisinin in the region of Bobo. The *Pfmdr-1* N86Y marker seems to be involved in the amodiaquine resistance *in vitro*.

Key words: *In vitro* resistance- *Plasmodium falciparum*-antimalarial- *Pfmdr1* mutation -Bobo Dioulasso.

## INTRODUCTION

La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* constitue l'un des obstacles majeurs qui entravent l'activité des programmes nationaux de lutte contre le paludisme depuis des décennies[1]. Plusieurs travaux effectués pour comprendre le phénomène ont démontré que *P.falciparum* présente un polymorphisme génétique entraînant une diversité de souches dont certaines sont impliquées dans la chimiorésistance [2]. C'est ainsi que pour les amino-4-quinoléines, il a été démontré que certaines mutations au niveau des gènes *Pfcr1 et Pfmdr-1 N86Y* sont associées à la résistance à ce groupe [3,4]. Dès lors, la recherche des phénomènes à la base de la chimiorésistance s'oriente de plus en plus vers la recherche de mutations au niveau des gènes candidats responsables de cette résistance [2,3,4].

Pour faire face au phénomène de la chimiorésistance, la plupart des pays des zones d'endémie ont changé leur politique de traitement du paludisme simple avec l'adoption des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine [1]. C'est ainsi que le Burkina Faso à l'instar de ces pays a changé sa politique de traitement en 2005 avec l'adoption des combinaisons fixes Artémether-Luméfantrine (AL) en première intention et Amodiaquine+Artésunate (ASAQ) en deuxième intention pour le traitement du paludisme simple et de la quinine pour le traitement du paludisme grave. Toutefois,

l'adoption de cette nouvelle politique doit s'accompagner d'une surveillance de la sensibilité des souches de *P. falciparum* vis-à-vis des antipaludiques utilisés afin de gérer la chimiorésistance à ces médicaments [5].

Bien que la nouvelle politique de traitement du paludisme préconise l'utilisation de AL en première intention, force est de constater qu'à l'heure actuelle, seule la combinaison ASAQ est disponible au niveau de nos formations sanitaires périphériques[5].

En 2008, soit trois ans après l'adoption de la nouvelle politique de traitement du paludisme simple au Burkina Faso, nous avons initié une étude afin de mesurer la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux médicaments actuellement utilisés à savoir la quinine, la monodeséthylamodiaquine (métabolite de l'amodiaquine) et la dihydroartémisinine (métabolite de l'artemether). Nous avons également exploré dans la même étude la fréquence de la mutation *Pfmdr-1 N86Y* et sa relation avec la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques.

## MATERIEL ET METHODE

### *Site d'étude*

L'étude s'est déroulée de Septembre à Novembre 2008 dans la ville de Bobo-Dioulasso qui est le chef lieu de la région des Hauts Bassins (Ouest du Burkina Faso). Bobo-Dioulasso est la deuxième ville du Burkina Faso et est également la capitale économique du pays. Elle a une superficie de

16672 km<sup>2</sup> avec une population d'environ 632641 habitants en 2006.

La ville de Bobo-Dioulasso a un climat de type soudano-sahélien (6 mois de saison pluvieuse et 6 mois de saison sèche). Le paludisme y est à transmission saisonnière avec une recrudescence pendant la saison des pluies (Juin-Novembre).

### **Population d'étude et échantillons**

Les patients ont été sélectionnés dans 3 Centres de santé (CSPS) de la ville (Sarfaloa, Colsama et Ouezzin-ville).

La population d'étude était constituée de patients fébriles avec une température axillaire supérieure ou égale à 37°5 C et présentant des signes cliniques évocateurs de paludisme. Les malades ont été inclus dans l'étude s'ils répondaient aux critères d'inclusion qui étaient les suivants : âge supérieur ou égal à 6 mois, infection mono spécifique à *P. falciparum*, une parasitémie d'au moins 4000 parasites asexués par microlitre de sang (P/ $\mu$ l) et un consentement éclairé des parents. Un prélèvement veineux de 5 à 10 ml sur un anticoagulant (EDTA) et un confetti ont été effectués pour chaque patient inclus.

Avant le début de l'étude, ce protocole a été soumis et approuvé par le comité d'éthique institutionnel du Centre Muraz.

### **Les tests in vitro**

Pour les tests *in vitro*, nous avons utilisé la technique du microtest isotopique de DesJardins

[6]). Les solutions mères de monodeséthylamodiaquine anhydre (Sapec), de dihydroartémisinine (Sigma Chemical Company) et de quinine hydrochloride anhydre (Sigma Chemical Company, USA) ont été diluées dans de l'éthanol à 70%.

A partir de ces solutions mères (sm), des dilutions ont été effectuées pour obtenir des solutions filles.

Les solutions filles obtenues ont été distribuées dans les plaques de culture à raison de 50  $\mu$ l par puits. Les concentrations de médicaments dans les puits variaient de 3,75 à 1920 nM/L pour la monodeséthylamodiaquine, de 13,1 à 3333 nM/L pour la quinine et de 0,12 à 6 nM/L pour la dihydroartémisinine [7].

Les globules rouges parasités ont été dilués dans des érythrocytes sains du groupe 0 + (Banque de sang, Hôpital de Bobo - Dioulasso) si nécessaire enfin d'obtenir une parasitémie comprise entre 2.000 et 10.000 GRP / $\mu$ l de sang. Les hématies ont ensuite été mises en suspension dans de l'hypoxanthine tritié (Amersham, Little Chalfont, Royaume Unis) et du RPMI 1640 (Sigma, USA) supplémenté à 10% de sérum humain (lot n° S029009S4190 du distributeur ABCYS, 5 rue P chausson 75010 Paris). La suspension globulaire ainsi obtenue a été distribuée à raison de 200 $\mu$ l/puits et les plaques ont ensuite été incubées à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) pendant 48 heures. La collecte des plaques a été effectuée à l'aide d'un collecteur cellulaire (Skatron) et la lecture de l'incorporation radioactive à l'aide d'un

compteur bêta (LSS 6000 Beckmann) en présence de 2 ml du liquide scintillant (Amersham, Royaume Uni).

Les résultats d'inhibition de la croissance de *P. falciparum* en fonction de la concentration d'antipaludique sont exprimés en coup par minute (CPM). Ils sont interprétés par analyse de la régression linéaire. L'activité du médicament est exprimée en Concentration Inhibitrice 50% (CI 50). La CI50 est définie comme la concentration du médicament qui inhibe 50 % d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée par rapport aux cupules témoins. Les seuils de résistance *in vitro* sont estimés à CI 50  $\geq$  à 800 nM pour la quinine, CI 50  $\geq$  60 pour l'amodiaquine. Le seuil n'est pas encore défini pour la dihydroartémisinine [7,8].

#### **Analyses de la mutation *Pfmdr-1 N86Y***

L'ADN parasite a été extrait à partir des confettis. L'extraction a été effectuée selon la technique du Chelex-100 décrit par Plowe [9]. La détection de la mutation du gène *Pfmdr-1 Y86* a été effectuée en utilisant la technique d'une double Réaction de Polymérisation en Chaîne nichée (Nested PCR) suivi d'une digestion enzymatique [4]. La 1ère PCR a été effectuée en utilisant les amorces MDR1 5'-ATGGGTAAAGAGCAGAAAGA-3' et MDR2 5'-AACGCAAGTAATACATAAAGTCA-3' et ensuite la deuxième PCR a été effectuée en utilisant les amorces MDR3 5'-TGGTAACTCAGTATCAAAGAA-3' et MDR4 5'-

ATAAACCTAAAAAGGAACTGG-3'. Le produit de cette deuxième PCR a été soumis à une digestion enzymatique avec *AfIII* (New England Biolabs), qui coupe uniquement les gènes mutant en deux fragments de 226 bp et de 295 bp. Pour chaque série d'échantillons, nous avons utilisé de l'eau comme contrôle négatif et l'ADN des clones 3D7 et Dd2 de *P. falciparum* respectivement comme contrôle sauvage et comme contrôle mutant.

## **RESULTATS**

### **Tests *in vitro***

Au total 40 échantillons ont bénéficié de tests *in vitro* au cours de l'étude avec un taux de succès de 95% (2 tests non interprétables). Le tableau 1 résume la répartition des tests effectués avec les moyennes de CI50 ainsi que les valeurs extrêmes pour chacun des médicaments testés. **Ces résultats indiquent une très bonne sensibilité** des souches testées à la dihydroartémisinine avec une moyenne de 1,3nM/L (valeurs extrêmes : 1 et 2 nM/L) et à la quinine (moyenne de CI50 de 27,1 nM/L) car aucun cas de résistance *in vitro* n'a été rapporté à ces médicaments. Cependant, pour la monodeséthylamodiaquine, nous avons rapporté trois cas de résistance (7,9%) à ce médicament. Les CI50 pour ces trois souches résistantes (S1, S2, S3) étaient respectivement de 123,5nM/L, 83,6nM/L et 71,1nM/L. Par comparaison des antipaludiques deux à deux, il apparaît que la dihydroartémisinine, a montré une efficacité supérieure à celle de la quinine

Tableau 1 : Moyennes des Ci 50 des antipaludiques classiques

<b>Antipaludéens</b>	<b>Moyenne CI 50 (nM/L)</b>	<b>CI50 maximale(nM/L)</b>	<b>CI50 minimale(nM/L)</b>
Monodeséthylamodiaquine(AQ)	26,4	123,5	3,3
Dihydroartémisinine (DHA)	1,3	2	1
Quinine (Q)	27,1AQ/DHAP < 10 <sup>-6</sup>	94,8AQ/QP = 0,9	6,9DHA/QP < 10 <sup>-6</sup>

Tableau 2: Résultats des tests couplés *in vitro* et PCR

<b>Activité <i>in vitro</i> des souches face aux antipaludiques testés</b>	<b>Profil PCR des souches testées</b>		
	Souches sauvages	Souches mutantes	Souches mixtes
	N (%)	N (%)	N (%)
Souches sensibles aux trois antipaludiques testés N= 35 (92,1%)	27 (71)	4 (11,4)	4 (11,4)
Souches résistantes à la monodeséthylamodiaquine N= 3 (7,9%)	0	2 (66,6)	1 (33,3)
Total des souches testées N= 38 (100%)	27 (71)	6 (15,8)	5 (13,2)

(DHA/Q) avec une différence statistique très significative ( $P < 10^{-6}$ ). Cependant, aucune différence significative n'a été observée en comparant le couple AQ/Q ( $p = 0,9$ ).

### **Analyse moléculaire (PCR)**

Les résultats de l'analyse moléculaire effectuée sur les 38 isolats pour la recherche de la mutation *Pfmdr-1 N86Y* font ressortir une proportion de 71% (27/38) de souches portant le génotype sauvage, 16% (6/38) porteurs du génotype mutant et enfin 5 échantillons (13%) qui contenaient à la fois le génotype sauvage

et le génotype mutant (mixte) (Tableau 2). Toutefois en considérant les génotypes mixtes et mutants ensembles nous obtenons 29% de souches portant le génotype mutant (Tableau 2).

### **Tests couplés *in vitro* / PCR**

Dans l'ensemble, nous avons noté une forte proportion de souches sauvages (71%, 27/38) que de mutants (29%, 11/38) purs et mixtes

En ce qui concerne la monodeséthylamodiaquine (AQ), pour lequel il a été rapporté 3 cas de résistance *in vitro* (7,9%, 3/38), le profil du gène *Pfmdr-1* était du type mutant (Y86) pour

l'ensemble de ces 3 isolats (100%) dont deux étaient des mutants purs et un était mixte (Tableau 2).

Parmi les 35 isolats sensibles (92,1%, 35/38) à la monodeséthylamodiaquine (AQ), nous avons noté une forte proportion de souches sauvages (77%, 27/35) (Tableau2).

Pour la dihydroartémisinine et la quinine pour laquelle il n'a été rapporté aucun cas de résistance, nous avons noté une forte proportion de souches avec le génotype sauvage (71%, 27/38). Parmi les 11 (28,9%, 11/38) échantillons portant le génotype mutants, 6 étaient des mutants purs alors que 5 étaient mixtes (Tableau 2).

## DISCUSSION

Les résultats de notre étude rapportent 7,9% de résistance *in vitro* à la monodeséthylamodiaquine.

Ce qui indique que trois ans après le changement de la politique de traitement du paludisme, l'amodiaquine reste encore efficace au Burkina Faso. Ces résultats viennent encore justifier le bon choix de cette politique [5]. Cependant, du fait de l'indisponibilité de la combinaison AL dans les formations sanitaires au Burkina Faso, bien qu'il ait été adopté, il ya un risque d'une pression importante sur la combinaison ASAQ pouvant entraîner une sélection de souches résistantes à l'amodiaquine dans le temps.

Si ailleurs en Afrique et notamment au Sénégal et au Gabon, il a été rapporté une baisse de sensibilité à la quinine [10,11], cette molécule reste

efficace au Burkina Faso [5]. En effet, la bonne efficacité de la quinine rapportée dans notre étude est similaire aux résultats rapportés par d'autres auteurs au Burkina Faso [12,13] et qui justifie son choix pour la prise en charge du paludisme grave. Cette bonne sensibilité à la quinine pourrait également se justifier par le fait que pendant longtemps, ce médicament a été exclusivement réservé pour le traitement du paludisme grave [5].

Une étude d'efficacité avec l'ASAQ au Burkina Faso rapporte d'important taux de parasitémiées récurrentes dans le cas de paludisme simple [4]

obligeant un traitement avec la quinine. Dans ce contexte et afin de protéger la quinine, il est important que les autorités politiques accélèrent la mise à disposition de AL qui devait être conformément à la nouvelle politique, le traitement alternatif à ASAQ en cas d'échec.

De toutes les molécules testées *in vitro*, la dihydroartémisinine (DHA) a montré une efficacité d'action inhibitrice supérieure à celles des autres avec une différence statistique très significative ( $P < 10^{-6}$ ). La bonne sensibilité de la dihydroartémisinine rapportée dans notre étude confirme la grande efficacité (valeur extrême maximale de 2 nM/L) plusieurs fois rapportée des dérivés de l'artémisinine [7,14,15]. Tout ceci justifie que les dérivés de l'artémisinine constituent aujourd'hui les molécules de base pour les combinaisons thérapeutiques contre le paludisme [1,5]. En effet, il a même été rapporté ailleurs une grande efficacité de ces dérivés sur des souches

de *Plasmodium falciparum* ayant présentées une résistance à la quinine [14].

L'étude de la relation entre la présence de la mutation *Pfmdr-1 N86Y* et la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques confirme pour l'amodiaquine ce qui avait été rapporté par d'autres études [3,4]. En effet, la forte relation entre la présence de cette mutation et la résistance *in vitro* à la monodeséthylamodiaquine des 3 souches vient confirmer le rôle essentiel que joue cette mutation dans la résistance à ce médicament. Cependant, une étude complémentaire du second gène candidat de résistance aux amino-4-Quinoleines, le *Pfcr1 T76* aurait permis d'être plus précis, notamment pour les cas de souches sensible chez lesquelles la mutation *Pfmdr-1 N86Y* a été rencontré. En effet, une étude conduite par Tinto et coll.[4] avec l'amodiaquine *in vivo* et qui avait analysé les deux gènes candidats avait conclu à une implication des deux mutations avec cependant un rôle secondaire du gène *Pfmdr-1 N86Y*.

## CONCLUSION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux constituants des 2 médicaments (ASAQ et quinine) actuellement disponibles dans l'arsenal thérapeutique du Burkina Faso. Nos résultats indiquent qu'il ya toujours de bonnes raisons de garder l'ASAQ comme traitement de deuxième intention du paludisme simple au Burkina Faso, conformément à la recommandation actuelle. En

effet nous avons noté une très bonne efficacité des souches testés à la dihydroartémisinine et une faible résistance à la monodeséthylamodiaquine. Nous avons également noté une très bonne sensibilité de la quinine pour laquelle aucun cas de résistance n'a été rapporté. Toutefois il est urgent que la première combinaison (AL) recommandée dans la nouvelle politique soit mise rapidement à disposition pour non seulement offrir une alternative thérapeutique à ASAQ, mais également évité l'usage de la quinine pour le traitement du paludisme simple comme cela se fait actuellement. L'étude de la relation entre la présence de la mutation *Pfmdr-1 N86Y* et la sensibilité des souches *in vitro* confirme le rôle essentiel que joue ce gène dans la résistance aux amino-4-Quinoleines.

## REFERENCES

1. WHO. The World malaria report. 2008. Geneva: World Health Organization (Accessed february 2009, at: <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>)
2. Ochong EO, Van Den Broek IV, Keus K & Nzila A. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. Am J Trop Med Hyg. 2003;69:184-187.

- 3. Tinto H, Rwagacondo C, Karema C, Mupfasoni D, Vandoren W, Rusanganwa E, Erhart A, Van O, Umberto A.** Relationship between the *Pf crt T 76* and the *Pfmdr -1 Y 58* mutation in *Plasmodium* and *in vitro / vivo* Chloroquino- resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infect Genet Evolut.* 2003;3:287- 292.
- 4. Tinto H, Lougue G, Zongo I, Guiguemde GTR, Umberto A, Ouedraogo JB.** Chloroquine-resistance molecular markers (*Pfcrt T76* and *Pfmdr-1 Y86*) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Med Int Health.* 2008;13:238-240.
- 5. Programme Nationale de Lutte Contre le Paludisme (PNLP).** Plan d'action 2007, 37p.
- 6. Desjardins RE, Canfields CJ, Haynes JP, Chnulay JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16: 710-718.
- 7. Tinto H, Rwagacondo C, Karema C, Mupfasoni D; Vandoren W, Rusanganwa E, Erhart A, Van O, Umberto A.** *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to monodesethylamodiaquine, dihydroartemisinin and quinine in an area of high chloroquine resistance in Rwanda. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:509-514.
- 8. Legrand E, Volney B, Meynard JB, Esterre P, and Mercereau-Puijalon O.** Resistance to Dihydroartemisinin *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5): 808-809.
- 9. Plowe CV, Djimde´ A, Bouare M, Doumbo O & Wellems TE.** Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52:565-568.
- 10. Pradines B, Rogier C, Fusal T, Tall A, Trape JF, Doury JC.** Sensibilité *in vitro* de 85 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Med Trop.* 1996;56:141-145.
- 11. Ndong JM, Atteke C, Aubouy A, Bakary M, Lebibi J, Deloron P.** *In vitro* activity of chloroquine, amodiaquine, quinine, mefloquine and halofantrine against Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trop Med Health.* 2003;8(1):25-29.
- 12. Ouedraogo JB, Dutheil Y, Tinto H. et al.** *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Halofantrine compared with Chloroquine, Quinine and Mefloquine in the region of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Int Health.* 1998;3 (5):381-384.



- 13. Tinto H, Ouedraogo JB, Traoré B, Guiguemde TR, Zampa O.** Étude de la sensibilité *in vitro* de 232 isolats de *Plasmodium falciparum* aux antipaludéens au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). Bull Path Exot. 2001;4(2 Bis):188-191.
- 14. Karbwang J, Mungthin M, Thanavibul A et coll.** Artemether saved a patient with severe *falciparum* malaria after quinine treatment failure (R111 type of quinine resistance) southeast asian. Med Parasitol. 1995;46:38-40.
- 15. Pharath Lim, Alisa P Alker, Nimol Khim, Naman K Shah, Sandra Incardona, Socheat Doung, and al.** *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. Malar J. 2009;8:11.

---

***Correspondance*** : Dr Bamba Sanata  
Institut supérieur des sciences de la santé (INSSA),  
Université polytechnique de Bobo Dioulasso-Burkina Faso  
01 1091 Bobo Dioulasso  
Email: hsanata@yahoo.fr  
Tél: 00226 70 44 80 75/ 00226 78 83 48 49