

Distinguer les populations de *Plasmodium falciparum* en recherche clinique

Eboumbou Moukoko EC^{1,2,3}, Bogreau H², Briolant S², Pradines B², Rogier C²

1. Département des Sciences Biologiques, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala, BP2701, Douala, Cameroun.
2. Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires, Institut de Recherche Biomédicale des Armées - Antenne de Marseille (ex-IMTSSA) & Unité de recherche en maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR6236, Marseille, France.
3. Department of Medical Laboratory Science, Faculty of Health Sciences, University of Buea, Cameroon.

Med Trop 2009; **69** : 613-617

RÉSUMÉ • La diversité génétique de *Plasmodium falciparum* est généralement importante. Son étude permet de différencier les souches présentes chez un individu avant et après un traitement antipaludique, ou de vérifier si plusieurs individus ont été infectés par les mêmes parasites. L'interprétation des résultats du test *in vivo* d'efficacité des antipaludiques recommandé par l'OMS nécessite de distinguer les recrudescences des nouvelles infections lorsque la réapparition d'une parasitémie après un traitement suggère un échec thérapeutique et une résistance à ce traitement. Pour cela, des méthodes de biologie moléculaire comme les PCRs nichées se sont à présent démocratisées au point qu'elles peuvent être réalisées dans la plupart des zones d'endémie. Un effort de standardisation du génotypage de *P. falciparum* effectué pour distinguer les recrudescences des nouvelles infections a été réalisé. Cela concerne à la fois les méthodes de génotypage et les critères d'interprétation de leurs résultats. Le respect de ces recommandations est susceptible d'améliorer la qualité des travaux de recherche clinique et de permettre l'interprétation de résultats d'origine multicentrique.

MOTS-CLÉS • Paludisme. *Plasmodium falciparum*. Résistance. Génotypage. Msp1. Msp2. Glurp.

DISTINGUISHING *PLASMODIUM FALCIPARUM* POPULATIONS FOR CLINICAL RESEARCH

ABSTRACT • The genetic diversity of *Plasmodium falciparum* is generally high. Study of this diversity is useful to differentiate the strains present in an individual before and after malaria treatment or to check if several individuals have been infected by the same parasites. Interpretation of the *in vivo* test recommended by the WHO to evaluate antimalarial drug efficacy requires distinguishing recrudescence from new infection when recurrent parasitemia suggests the possibility of therapeutic failure and antimalaria resistance. For this purpose, molecular biology techniques such as nested-PCRs are becoming increasingly available and can now be used in most endemic areas. An effort has been made to standardize *P. falciparum* genotyping carried out to distinguish recrudescence from new infection. Standardization has focused not only on genotyping methods but also on interpretation criteria. Compliance with these recommendations should improve the quality of clinical research and allow comparison of data from different centers.

KEY WORDS • Malaria. *Plasmodium falciparum*. Resistance. Genotyping. Merozoite surface protein 1. Merozoite surface protein 1. Glutamate-rich protein.

L'émergence de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, s'est accompagnée d'une augmentation importante de la morbidité et de la mortalité par paludisme (1-3). L'augmentation de cette résistance a poussé les responsables de la lutte contre le paludisme à adopter les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) pour le traitement des accès palustres. La combinaison de deux molécules vise à retarder l'émergence de résistances, chaque molécule « protégeant » l'autre. Le choix des dérivés de l'artémisinine était justifié par l'absence de résistance à ces composés et par leur importante efficacité et rapidité d'action (4). Leur introduction a eu un impact majeur sur le paludisme (5, 6) en limitant la létalité et en diminuant le réservoir de parasites. *P. falciparum* est cependant capable de s'adapter en permanence et de développer des résistances contre tous les antipaludiques, y compris contre les ACT (7-9). Afin d'adapter en temps voulu les régimes thérapeutiques, il est indispensable de surveiller régulièrement l'ef-

ficacité des antipaludiques. Pour cela, la méthode de référence est le test *in vivo* standardisé recommandé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (1, 10). Il consiste à administrer une dose standard de l'antipaludique étudié à une sélection de malades infectés par *P. falciparum* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie puis l'absence de leur réapparition. En l'absence de guérison avant le 4^e jour après le début du traitement, des critères parasitologiques et cliniques permettent de définir les échecs thérapeutiques précoces. Si une parasitémie à *P. falciparum* est détectée entre le 4^e jour et le dernier jour du suivi alors qu'elle avait disparu avant le 4^e jour, il s'agit d'un échec parasitologique tardif (ou d'un échec clinique tardif si la réapparition de la parasitémie est symptomatique).

Il est généralement considéré que la réapparition d'une parasitémie à partir du 8^e jour après le début du traitement peut être due à la résistance de *P. falciparum* à l'antipaludique ou à une nouvelle infection par des parasites qui n'étaient pas présents au début du traitement. Cette nouvelle infection pourrait faire faussement diagnostiquer l'existence d'une résistance. Une telle erreur est d'autant plus probable que les individus sont exposés à une transmission

• Correspondance : elsecarole@yahoo.fr

• Article reçu le 31/08/2009, définitivement accepté le 22/10/2009.

importante, c'est à dire qu'ils sont porteurs de formes pré-érythrocytaires du parasite au moment ou peu après le début du traitement. La plupart des antipaludiques étant peu ou pas actifs sur ces formes, ce n'est que lorsque les formes érythrocytaires émergent des hépatocytes qu'ils peuvent être atteints. Si cette émergence se produit alors que la concentration du médicament dans le sang n'est plus suffisante pour empêcher la croissance parasitaire, une parasitémie peut alors se développer. Pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité des antipaludiques, il est donc apparu nécessaire de corriger les estimations de la fréquence des échecs thérapeutiques pour tenir compte du biais introduit par les nouvelles infections.

Dans certaines situations, il peut être intéressant de savoir si des individus porteurs de *P. falciparum* ont été infectés par un même anophèle ou un petit nombre d'anophèles (11, 12). Seule la parfaite similitude génétique des souches permet de montrer que les mêmes parasites ont été inoculés par le même vecteur ou le même petit nombre de vecteurs infectés sur le même réservoir. En effet, la probabilité que deux anophèles soient infectés par exactement les mêmes souches de *P. falciparum* est généralement quasi nulle en zone d'endémie et reste faible au cours d'épidémies de paludisme. Cela n'arrive que dans les zones où les populations de *P. falciparum* sont clonales ou oligoclonales. C'est le cas, par exemple de foyers isolés d'Amérique du sud et du «paludisme de maisonnée» (11) où un petit nombre d'anophèles s'infectent sur un même réservoir de parasites, souvent un seul individu porteur de gamétocytes.

Des méthodes de biologie moléculaire reposant sur la PCR (réaction de polymérisation en chaîne pour l'amplification de l'ADN) permettent de distinguer les populations de *P. falciparum* qui diffèrent génétiquement (i.e. par leur séquence ADN) au niveau de régions de chromosomes (i.e. loci) particulièrement polymorphes. Un groupe d'experts a été réuni en 2007 par l'OMS pour élaborer des recommandations concernant le génotypage parasitaire utilisable pour distinguer les recrudescences vraies des nouvelles infections parmi les échecs tardifs observés au cours des tests *in vivo* d'évaluation de l'efficacité des antipaludiques (13). L'essentiel de ces nouvelles recommandations sur le génotypage de *P. falciparum* et en particulier celles concernant leur interprétation sont présentées ici.

Schéma de collecte des échantillons

Dans le cadre des essais *in vivo* d'efficacité des antipaludiques (i.e. tests *in vivo* de l'OMS), il est recommandé de collecter un échantillon de sang contenant les plasmodies à J0, juste avant le début du traitement, et le jour de l'échec thérapeutique (i.e. de la réapparition de la parasitémie) à partir de J7, c'est à dire 8 jours après le début du traitement (13). Les échecs survenant avant J7 sont présumés dus aux parasites présents initialement et ne nécessitent pas de génotypage. Il n'a pas été jugé nécessaire d'effectuer plusieurs prélèvements à un jour d'intervalle pour détecter des parasites qui auraient été séquestrés dans les capillaires profonds à J0 (i.e. qui ne seraient détectables dans le sang périphérique qu'à J1)(13). Pourtant, en l'absence de possibilité de réinfection (i.e. patient hospitalisé en France métropolitaine, sans retour en zone d'endémie) et après traitement par l'association atovaquone-proguanil, il a été possible d'observer des génotypes différents au prélèvement initial (J0) et au moment de la rechute (JX). Dans ce cas, on considère qu'un clone minoritaire résistant à l'atovaquone et au proguanil était indétectable à J0, puis sélectionné par le traitement et identifié lors de l'échec clinique à JX (14).

Dans le cadre de la comparaison des infections plasmodiales de plusieurs individus, il est préférable qu'ils soient prélevés simultanément.

Collecte, transport et conservation des échantillons

Le sang infecté peut être collecté directement sur anticoagulant (sur EDTA ou citrate, pas sur héparine qui inhibe les PCRs) ou sur buvard (papier filtre). Bien que cette dernière méthode s'accompagne d'une diminution de la sensibilité de la détection des parasites (15), elle est souvent préférée pour des raisons pratiques, de transport, de coût et d'acceptabilité. Un volume de 50 à 200 µL de sang capillaire est donc généralement prélevé et séché sur papier filtre. Les buvards utilisés pour collecter, transporter et conserver l'ADN parasitaire devraient obligatoirement être des supports traités et commercialisés pour assurer une meilleure conservation de l'ADN (13). Plusieurs de ces buvards sont disponibles dans le commerce. Les «Generation® Capture Cards» (Genra/Qiagen) et «FP705(tm) DNA collection paper» (FITZCO) permettent de conserver l'ADN des échantillons séchés pendant au moins 9 mois à température ambiante et probablement plus longtemps à -20°C. Les «FTA® Whatmann cards» lysent les cellules, dénaturent les protéines, inactivent les pathogènes sanguins et protègent l'ADN des UV. Les échantillons n'étant plus infectieux, ils peuvent être transportés par voie postale ordinaire, sans mesure particulière de bio-sécurité. Ils peuvent être conservés à température ambiante pendant plusieurs années. L'ADN doit être extrait selon les recommandations des fournisseurs.

A défaut, des buvards non traités (type Whatmann 3MM®) peuvent être utilisés mais uniquement dans le cadre de la surveillance des résistances en santé publique, pas dans le cadre d'essais cliniques réglementaires menés en vue d'une autorisation de mise sur le marché (13). En effet, la conservation de l'ADN sur ces buvards est moins bonne et cela peut altérer la qualité du génotypage et augmenter la proportion de données manquantes. Les buvards non traités doivent être bien séchés avant d'être stockés en sachet individuel (pour éviter les contaminations entre échantillons), avec des dessiccateurs et à -20°C pour assurer la conservation de l'ADN. Différentes méthodes ont été proposées pour extraire l'ADN de ces buvards (16-20).

Il est préférable d'utiliser immédiatement l'ADN extrait à partir des buvards pour réaliser les techniques de génotypage. En effet, les congélations et décongélations successives entraînent une diminution importante de la sensibilité de la détection des parasites par PCR (15).

Génotypage

Les loci généralement génotypés sont des gènes polymorphes codant des antigènes de *P. falciparum* : Msp1, Msp2 et Glurp (21, 22). D'autres loci comme des microsatellites ou d'autres gènes d'antigènes ont pu être utilisés (12, 23) mais leur polymorphisme et donc leur pouvoir discriminant peuvent être moins importants que les trois loci précédents pour différencier les isolats de *P. falciparum*. Parmi ces trois loci préconisés pour le génotypage, *msp2* et *glurp* sont généralement reconnus comme étant plus polymorphes et plus discriminants que *msp1*. Il est donc recommandé

Marqueurs moléculaires des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

de commencer le génotypage par *msp2* ou *glurp* avant d'utiliser *msp1* (13).

Le génotypage fait généralement appel à la PCR nichée (ou «double PCR») qui maximise la sensibilité et la spécificité de la détection des séquences ADN recherchées. Pour chaque locus, un premier couple d'amorces permet d'amplifier une large portion de la région variable du gène/locus étudié. Un deuxième couple d'amorce permet, à partir de cette première fraction d'ADN amplifiée, d'amplifier une région plus petite et interne à la première. Le deuxième couple d'amorces est spécifique de familles alléliques dénommées «K1», «Mad20» et «Ro33» pour *msp1* et dénommées «IC3D7» et «FC27» pour *msp2*, en référence aux clones parasitaires prototypes de ces familles ; il n'y a pas de distinction de familles alléliques pour *glurp*. Un des protocoles de génotypage le plus utilisé est présenté dans le «Methods in Malaria Research» (5^e édition) qui peut être téléchargé sur les sites du MR4 (www.mr4.org) ou de BioMalPar (www.biomalpar.org) (24).

Ces PCRs amplifient des fragments d'ADN de *P. falciparum* qui varient par leur taille en raison des nombres variables de répétition en tandem de séquences (motifs) de quelques nucléotides, et par leur famille allélique déterminée par les séquences ADN reconnues par les amorces secondaires dans le cas de *msp1* et *msp2*. Les gènes *msp1*, *msp2* et *glurp* étant en copie unique dans le génome de *P. falciparum*, la mise en évidence de fragments d'ADN amplifiés différant par leur taille (ou leur famille) pour un locus/gène donné signe la présence d'autant de variants génétiques (allèles) et donc d'isolats distincts de *P. falciparum*. L'analyse de la taille des fragments devrait idéalement s'effectuer par électrophorèse capillaire sur séquenceur automatique (13). A défaut, cette analyse est le plus souvent effectuée sur gel d'agarose. Dans tous les cas, les échantillons à comparer doivent être analysés simultanément, côte à côte dans les gels d'agarose, pour être capable d'identifier sans erreur de petites différences de taille des fragments d'ADN amplifiés. Alors que l'électrophorèse capillaire permet de distinguer des différences de taille d'un nucléotide, l'électrophorèse sur gel d'agarose ne permet guère en pratique de distinguer que des différences de 10 nucléotides ou plus. Dans ce dernier cas, un logiciel d'analyse d'image digitalisée peut être utile ou l'interprétation des gels doit être effectuée de façon indépendante par deux lecteurs expérimentés.

Deux isolats génétiquement distincts peuvent cependant avoir des allèles différents (fragment d'ADN amplifié de tailles ou de familles différentes) à un locus donné et le même allèle à un autre locus. Le premier locus permet de les différencier, pas le deuxième. Pour cette raison, il est généralement nécessaire d'utiliser plusieurs loci pour s'assurer d'un pouvoir discriminant suffisant. Il suffit que deux isolats aient des allèles différents à au moins un locus/gène pour être considérés comme différents. Les loci/gènes monomorphes (présentant un seul allèle) ou oligomorphes (présentant un petit nombre d'allèles) sont donc peu discriminants. La diversité génétique à un locus/gène donné de *P. falciparum* dépend de l'épidémiologie locale du paludisme. Dans les zones de forte endémie, certains loci peuvent montrer une diversité génétique très élevée (25-29) alors que dans des zones isolées de faible endémie où les populations plasmodiales sont clonales ou oligoclonales, les mêmes loci montreront une diversité faible (30, 31). La diversité génétique est mesurée par l'indice He de Nei (index d'hétérozygotie attendue (32)) qui est une estimation de la probabilité que deux individus (i.e. deux isolats de *P. falciparum*) tirés au sort aient des allèles différents à un locus donné. Pour *P. falciparum*, cet indice peut être supérieur à 90% en zone de forte

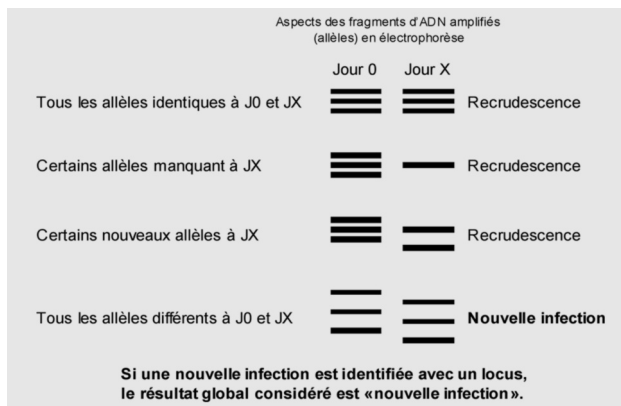


Figure 1. Définition consensus de la «recrudescence» et de la «nouvelle infection» selon les allèles identifiés à un locus juste avant un traitement (J0) et au moment de l'échec (JX) d'après (13).

endémie (33), de l'ordre de 80% en zone de faible endémie, et de l'ordre de 35% ou moins au cours d'épidémies de paludisme (30) ou dans des zones isolées de très faible endémie comme il en existe en Amérique du Sud (31). Ces valeurs de l'indice de Nei permettent d'estimer le pouvoir discriminant des loci/gènes utilisés. Le nombre d'allèles identifiés pour chaque locus sur une série d'au moins une cinquantaine d'échantillons (i.e. parmi ceux prélevés à J0) donne aussi une indication de leur diversité génétique et de leur pouvoir discriminant (13).

Interprétation des résultats des génotypages dans le cadre d'essais d'efficacité

La comparaison des profils génétiques (allèles) des isolats présents juste avant le début d'un traitement (J0) et ceux détectés au moment de l'échec thérapeutique (JX) pour distinguer une nouvelle infection d'une recrudescence doit reposer sur une définition consensuelle (Fig. 1). Il est recommandé de considérer qu'une souche présente à JX est une nouvelle infection si tous les allèles présents à JX diffèrent de ceux de J0 à un ou plusieurs loci analysés (13). Il est aussi recommandé de considérer qu'une souche présente à JX est une recrudescence si à chaque locus analysé, au moins un allèle est présent à la fois à J0 et à JX (13). Dès qu'une nouvelle infection est diagnostiquée pour au moins un locus analysé, le résul-

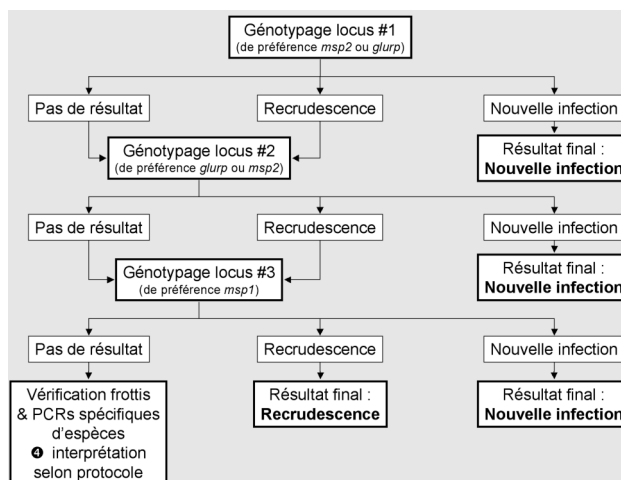


Figure 2. Arbre décisionnel pour interpréter les résultats de génotypage sur trois loci dans le cadre d'essais d'efficacité d'antipaludique d'après (13).

tat global doit être «nouvelle infection», même si les résultats aux autres loci concluent à une recrudescence.

L'arbre décisionnel pour l'interprétation des résultats de génotypage de trois loci est présenté sur la figure 2. Après le génotypage du troisième locus, il est possible qu'aucune amplification n'ait été obtenue. Si aucune amplification n'a été obtenue pour les trois loci, il est nécessaire de relire les frottis et gouttes épaisses et, si possible, d'effectuer une PCR spécifique d'espèce plasmodiale. Si une nouvelle espèce plasmodiale (i.e. autre que *P. falciparum*) est identifiée à JX (alors qu'elle était absente à J0), on considère qu'il s'agit d'une nouvelle infection (résultat définitif). Si *P. falciparum* est trouvé à JX, le résultat du génotypage est considéré comme ininterprétable. Si enfin aucune amplification n'a été obtenue pour un ou deux loci, le résultat pour l'autre ou les deux autres loci étant considéré comme une recrudescence, on considère qu'il s'agit d'une recrudescence (résultat définitif).

Assurance et contrôle de qualité

La réalisation de grandes séries de PCRs est sujette à un risque élevé d'erreurs et de contaminations (i.e. amplification d'un fragment d'ADN issu d'une manipulation précédente et non pas des parasites présents dans l'échantillon sanguin) qu'il est nécessaire de prévenir.

Les mesures à respecter au sujet des contaminations sont les suivantes. Des «contrôles de contamination» (contrôles négatifs), comportant du sang humain non infecté pour le contrôle d'extraction d'ADN et de PCR ou de l'eau pour le contrôle de PCR doivent être insérés systématiquement dans chaque expérience et être insérés de façon aléatoire parmi les échantillons ou en fin de série. Si une contamination est identifiée (i.e. par détection d'un produit de PCR dans un contrôle négatif), aucun résultat ne doit être considéré comme valide et tous les travaux de génotypage doivent être arrêtés jusqu'à ce que la source de contamination soit identifiée et éliminée. Les étapes de préparation des réactifs pour les PCR doivent être clairement séparées dans l'espace. La préparation-extraction de l'ADN et la préparation des mélanges de réactifs pour PCR doivent être effectuées dans des pièces libres de tout produit de PCR, de préférence dans une hôte à flux laminaire. Les produits d'amplification ne doivent jamais être transportés et encore moins manipulés dans ces salles. Des jeux de pipettes différents doivent être utilisés dans chaque pièce et être marqués de façon visible et spécifique afin de vérifier qu'elles ne changent pas de pièce. Les manipulateurs doivent porter des blouses spécifiques de chaque salle (avec interdiction de sortir la blouse de la salle sauf pour son nettoyage, dans un sac à linge fermé). Les manipulations devraient être effectuées avec des gants qui ne sortent des salles que dans des poubelles scellées. Les emplacements de travail pour toutes les étapes de pré-PCR devraient être nettoyés après chaque expérience avec un liquide de lavage (solution d'acide 1-mol/l d'acide chlorhydrique ou d'une solution de nettoyage commerciale adaptée à la décontamination de l'ADN), suivi de séchage avec des serviettes de papier jetées dans une poubelle scellée à la fin de chaque manipulation. Aucun matériel ou contenant ne doit être transporté des secteurs de post-PCR vers des endroits consacrés à la préparation d'ADN et de mélange réactionnel. Des cônes à filtre (barrières d'aérosol) devraient préférentiellement être utilisés avec les pipettes pour manipuler les réactifs (en pré-PCR) et pour manipuler les produits d'amplification des PCR primaires (i.e. matrice des PCR secondaires).

Des contrôles positifs pour tous les génotypages doivent aussi être introduits dans chaque manipulation (24). Ces témoins positifs peuvent être obtenus du MR4 (www.mr4.org).

Des manuels contenant les procédures opératoires standardisées (SOP) spécifiques des manipulations effectuées dans chaque salle, devraient être maintenus à jour et disponibles dans chaque salle. Ces SOP devraient être connues des manipulateurs et cela devrait être vérifié formellement par des contrôles réguliers des connaissances et des pratiques.

Les résultats doivent être présentés de façon standardisée, compréhensible et claire afin de ne laisser place à aucune ambiguïté dans l'interprétation des données et le rendu des résultats. En particulier, une trace doit être gardée de tous les électrophorogrammes (e.g. copie des photographies de gels) pour étayer et valider, même a posteriori, tous les résultats.

La reproductibilité des résultats devrait être vérifiée sur environ 10% des échantillons (au moins 10 échantillons) choisis de façon aléatoire. L'ensemble du processus, de l'extraction d'ADN jusqu'à l'interprétation des résultats du génotypage doit être effectué à nouveau de façon indépendante. Il est considéré qu'un taux de discordance (i.e. différence dans le résultat final «recrudescence» vs. «nouvelle infection») inférieur ou égal à 10% est acceptable. S'il est supérieur, un autre échantillon de 10% des échantillons doit de nouveau être testé. Si le taux de discordance reste supérieur à 10%, l'ensemble du génotypage des échantillons est à refaire (13).

Conclusion

Les méthodes de biologie moléculaire comme les PCR nichées se sont à présent démocratisées au point qu'elles peuvent être réalisées dans la plupart des zones d'endémie. Un effort de standardisation du génotypage de *P. falciparum* effectué pour évaluer l'efficacité des antipaludiques et distinguer les recrudescences des nouvelles infections a été réalisé à l'invitation de l'OMS et de MMV. Cela concerne à la fois les méthodes de génotypage et les critères d'interprétation de leurs résultats. A l'initiative de la Fondation Bill et Melinda Gates, un réseau international de surveillance de la résistance aux antipaludiques (WorldWide Antimalarial Resistance Network) s'est donné le but de mettre en commun sur une même base toutes les données *in vivo*, *in vitro*, les génotypages et les données pharmacologiques en respectant des critères de standardisation et de qualité en cours de définition actuellement (34-37). Le respect de ces recommandations est susceptible d'améliorer la qualité des travaux de recherche clinique et de permettre l'interprétation de résultats d'origine multicentrique.

Références

1. WHO. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. Report on global monitoring : 1996-2004. Geneva : World Health Organisation ; 2005. Report No. : WHO/HTM/MAL/2005.1103.
2. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrees du Loû A, Delaunay V, *et al.* Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C R Acad Sci III* 1998 ; 321 : 689-97.
3. Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 64 : 12-7.
4. Ogbonna A, Eneke CJ. Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated malaria in sub-Saharan Africa : the efficacy, safety, resistance and policy implementation since Abuja 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 ; 102 : 621-7.
5. WHO. The world malaria report 2008. Geneva : World Health Organization ; 2008. Report No. : WHO/HTM/GMP/2008.1.

Marqueurs moléculaires des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

6. Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, Mufunda J, Abdulmumini U, Ogbamariam A, *et al.* A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004 : the effect of combination of control methods. *Malar J* 2006 ; 5 : 33.
7. Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 2619-20.
8. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14 : 716-9.
9. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 455-67.
10. WHO. Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué. Geneva : World Health Organisation ; 2004. Report No. : WHO/HTM/RBM/2003.50.
11. Cot S, Matra R, Rabarjaona L, Robert V, Raharimalala L, Raveloson A, *et al.* Mise en évidence d'une transmission urbaine autochtone du paludisme a Antananarivo, Madagascar. *Med Trop* 2006 ; 66 : 143-8.
12. Pomares-Estran C, Delaunay P, Mottard A, Cua E, Roger PM, Pradines B, *et al.* Atypical aetiology of a conjugal fever : autochthonous airport malaria between Paris and French Riviera : a case report. *Malar J* 2009 ; 8 : 202.
13. WHO. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy : genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization, 29-31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands. Geneva : World Health Organization ; 2008.
14. Savini H, Bogreau H, Bertaux L, Bouchiba H, Kraemer P, Parzy D, *et al.* First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52 : 2283-4.
15. Färnert A, Arez AP, Correia AT, Björkman A, Snounou G, do Rosário V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; 93 : 50-3.
16. Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996 ; 90 : 519-21.
17. Henning L, Felger I, Beck HP. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Trop* 1999 ; 72 : 149-55.
18. Chaisomchit S, Wichajarn R, Chowpreecha S, Chareonsiriwatana W. A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003 ; 34 : 641-5.
19. Berezky S, Mårtensson A, Gil JP, Färnert A. Short report : Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 72 : 249-51.
20. Pachot A, Barbalat V, Marotte H, Diasparra J, Gouraud A, Mougín B, *et al.* A rapid semi automated method for DNA extraction from dried-blood spots : application to the HLA-DR shared epitope analysis in rheumatoid arthritis. *J Immunol Methods* 2007 ; 328 : 220-5.
21. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, *et al.* Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR : a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ; 95 : 225-32.
22. Snounou G, Beck HP. The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today* 1998 ; 14 : 462-7.
23. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Poncon N, Stauffer WM, 3rd, Fontenille D, *et al.* Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerg Infect Dis* 2007 ; 13 : 1236-8.
24. Snounou G, Färnert A. Genotyping of *Plasmodium falciparum* parasites by PCR: msp1, msp2, and glurp. In «Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M. Methods in Malaria Research». 5th ed. Manassas & MR4 / ATCC & BioMalPared, Paris, 2008, pp 238-42.
25. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalón O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; 52 : 81-8.
26. Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, *et al.* Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg* 1996 ; 54 : 18-26.
27. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, *et al.* No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998 ; 59 : 726-35.
28. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalón O. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; 93 : 375-80.
29. Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, *et al.* Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 ; 93 : 21-8.
30. Rogier C, Pradines B, Bogreau H, Koeck JL, Kamil MA, Mercereau-Puijalón O. Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 11 : 317-21.
31. Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Stahl S, *et al.* Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 1999 ; 60 : 30-4.
32. Nei M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* 1978 ; 89 : 583-90.
33. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, *et al.* Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 74 : 953-9.
34. Bacon DJ, Jambou R, Fandeur T, Le Bras J, Wongsrichanalai C, Fukuda MM, *et al.* World Antimalarial Resistance Network (WARN) II : *in vitro* antimalarial drug susceptibility. *Malar J* 2007 ; 6 : 120.
35. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, *et al.* World Antimalarial Resistance Network (WARN) III : molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J* 2007 ; 6 : 121.
36. Price RN, Dorsey G, Ashley EA, Barnes KI, Baird JK, d'Alessandro U, *et al.* World Antimalarial Resistance Network I : clinical efficacy of antimalarial drugs. *Malar J* 2007 ; 6 : 119.
37. Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, Plowe CV. A network to monitor antimalarial drug resistance : a plan for moving forward. *Trends Parasitol* 2008 ; 24 : 43-8.