

Avis de Soutenance

Madame Océane DELANDRE

Biologie-Santé - Spécialité Maladies Infectieuses

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Etude de la résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline (Eurartesim) utilisée dans le traitement de première intention du paludisme simple à Plasmodium falciparum.

dirigés par Monsieur Bruno PRADINES

Soutenance prévue le **jeudi 11 avril 2024** à 14h00

Lieu : IHU Méditerranée Infection 19-21 Boulevard Jean-Moulin 13005 Marseille

Salle : Amphithéâtre

Composition du jury proposé

M. Bruno PRADINES	Institut de recherche biomédicale des armées	Directeur de thèse
Mme Sandrine HOUZÉ	Université Paris Cité	Rapporteuse
M. Antoine BERRY	Université de Toulouse III	Rapporteur
M. Pierre MARTY	Université Nice Sophia Antipolis	Examineur
Mme Nadine AZAS	Aix Marseille Université	Président

Mots-clés : Dihydroartémisinine-pipéraquline, Plasmodium falciparum, Résistance, Pression médicamenteuse, Nanopore, WGS

Résumé :

L'association dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA-PPQ) est recommandée dans le traitement de première intention du paludisme simple à Plasmodium falciparum. Cependant, le développement extrêmement rapide en Asie du phénomène de résistance à cette association, nécessite de surveiller l'émergence et la propagation de ces résistances en Afrique. Bien qu'un marqueur moléculaire ait été identifié et validé pour la résistance à l'artémisinine en Asie (Pfk13), il n'est retrouvé qu'en très faible proportion en Afrique, en dessous du seuil de résistance défini par l'organisation mondiale de la santé. Des marqueurs moléculaires de résistances ont également été identifiés pour d'autres antipaludiques mais certains restent très minoritaires en Afrique tel que le gène de la plasmepsine II (Pfp2), impliqué dans la diminution de sensibilité à la pipéraquline. Récemment des études ont démontré le rôle du transporteur PfCRT, initialement marqueur de résistance de la chloroquine, dans la résistance à la pipéraquline et ces mutations ont également été retrouvées minoritairement en Guyane. Cependant, des échecs thérapeutiques demeurent inexpliqués par nos connaissances actuelles nécessitant de les investiguer et d'identifier d'autres mécanismes de résistance. Cette thèse s'intéresse dans un premier temps à la surveillance des résistances en Afrique avec l'étude des principaux marqueurs moléculaires déjà identifiés tels que Pfk13 ou de candidats tels que le gène de la coronine (Pfcoronine), potentiellement impliqué dans la résistance à l'artémisinine. Nous avons également investigué deux échecs thérapeutiques à l'association DHA-PPQ. La deuxième

partie de cette thèse s'intéresse à l'identification d'un marqueur moléculaire de résistance à la pipéraquline par pression de sélection, in vitro. Pour ce faire, deux clones de Plasmodium falciparum (Pf3D7 et PfW2) ont subi des pressions croissantes de pipéraquline, allant jusqu'à 800 nM, durant 28 et 22 mois. L'analyse de leurs génomes complets a ensuite été réalisée en utilisant le PromethION de chez Oxford Nanopore Technologies. Les travaux menés ont permis de démontrer que les mutations du gène de la coronine, préalablement identifiées et validées, par mutagenèse dirigée, ne semblent pas avoir d'implications dans les échecs thérapeutiques à l'artémisinine en Afrique. Par ailleurs, l'étude de deux échecs thérapeutiques, n'a pas permis d'identifier une cause génétique. L'échec précoce semblerait être un phénomène de retard de clairance parasitaire sous artésunate, avant relais par dihydroartémisinine-pipéraquline, en lien avec une schizontémie initiale majeure ; alors que l'échec tardif à la DHA-PPQ demeure inexpliqué. Ensuite, les cycles de pressions de pipéraquline réalisés n'ont pas permis de générer une résistance. Cependant, il a été observé une adaptation ponctuelle des parasites à leur environnement. En effet, l'un des clones sous pression a montré un taux de survie au test du PSA de 20,5% en l'absence de mutations sur PfCRT et en l'absence d'amplification du gène de la plasmepsine II. De plus, les résultats des tests de chimiosensibilité « classique » de ce clone restent bien en dessous du seuil de résistance fixé. La totalité de ces travaux permet de confirmer la spécificité géographique des marqueurs bien identifiés et la nécessité de caractériser les isolats d'Afrique responsables d'échecs thérapeutiques. Enfin, les cultures de souches de référence de parasites sous pressions médicamenteuses à la pipéraquline n'ont pas induit de phénotype résistance ni de polymorphisme génétique. Des seuils plus élevés ou un temps d'exposition plus long pourraient être nécessaires.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

L'association dihydroartémisinine-pipéraquline (DHA-PPQ) est recommandée dans le traitement de première intention du paludisme simple à *Plasmodium falciparum*. Cependant, le développement extrêmement rapide en Asie du phénomène de résistance à cette association, nécessite de surveiller l'émergence et la propagation de ces résistances en Afrique. Bien qu'un marqueur moléculaire ait été identifié et validé pour la résistance à l'artémisinine en Asie (*Pfk13*), il n'est retrouvé qu'en très faible proportion en Afrique, en dessous du seuil de résistance défini par l'organisation mondiale de la santé. Des marqueurs moléculaires de résistances ont également été identifiés pour d'autres antipaludiques mais certains restent très minoritaires en Afrique tel que le gène de la plasmepsine II (*Pfpm2*), impliqué dans la diminution de sensibilité à la pipéraquline. Récemment des études ont démontré le rôle du transporteur PfCRT, initialement marqueur de résistance de la chloroquine, dans la résistance à la pipéraquline et ces mutations ont également été retrouvées minoritairement en Guyane. Cependant, des échecs thérapeutiques demeurent inexpliqués par nos connaissances actuelles nécessitant de les investiguer et d'identifier d'autres mécanismes de résistance.

Cette thèse s'intéresse dans un premier temps à la surveillance des résistances en Afrique avec l'étude des principaux marqueurs moléculaires déjà identifiés tels que *PfK13* ou de candidats tels que le gène de la coronine (*Pfcoronine*), potentiellement impliqué dans la résistance à l'artémisinine. Nous avons également investigué deux échecs thérapeutiques à l'association DHA-PPQ. La deuxième partie de cette thèse s'intéresse à l'identification d'un marqueur moléculaire de résistance à la pipéraquline par pression de sélection, *in vitro*. Pour ce faire, deux clones de *Plasmodium falciparum* (*Pf3D7* et *PfW2*) ont subi des pressions croissantes de pipéraquline, allant jusqu'à 800 nM, durant 28 et 22 mois. L'analyse de leurs génomes complets a ensuite été réalisée en utilisant le PromethION de chez Oxford Nanopore Technologies.

Les travaux menés ont permis de démontrer que les mutations du gène de la coronine, préalablement identifiées et validées, par mutagenèse dirigée, ne semblent pas avoir d'implications dans les échecs thérapeutiques à l'artémisinine en Afrique. Par ailleurs, l'étude de deux échecs thérapeutiques, n'a pas permis d'identifier une cause génétique. L'échec précoce semblerait être un phénomène de retard de clairance parasitaire sous artésunate, avant relais par DHA-PPQ, en lien avec une schizontémie initiale majeure ; alors que l'échec tardif à la DHA-PPQ demeure inexpliqué. Ensuite, les cycles de pressions de pipéraquline réalisés n'ont pas permis de générer une résistance. Cependant, il a été observé une adaptation ponctuelle des parasites à leur environnement. En effet, l'un des clones sous pression a montré un taux de survie au test du PSA de 20,5% en l'absence de mutations sur *Pfcrt* et en l'absence d'amplification du gène de la

plasmepsine II. De plus, les résultats des tests de chimiosensibilité « classique » de ce clone restent bien en dessous du seuil de résistance fixé.

La totalité de ces travaux permet de confirmer la spécificité géographique des marqueurs bien identifiés et la nécessité de caractériser les isolats d'Afrique responsables d'échecs thérapeutiques. Enfin, les cultures de souches de référence de parasites sous pressions médicamenteuses à la piperaquine n'ont pas induit de phénotype résistant ni de polymorphisme génétique. Des seuils plus élevés ou un temps d'exposition plus long pourraient être nécessaires.

Mots-clés : Dihydroartémisinine, Pipéraquine, *Plasmodium falciparum*, résistance, *Pfcoronine*, *PfK13*, Pression médicamenteuse, *in vitro*, Nanopore, WGS

Abstract

Dihydroartemisinin-piperaquine combination (DHA-PPQ) is recommended as first-line treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. However, resistances to this combination in Asia requires to monitor the emergence and spread of this resistance in Africa. A molecular marker has been identified and validated for artemisinin resistance in Asia (*Pfk13*) but it was found in very low proportions in Africa, below the resistance threshold defined by the World Health Organization. Molecular markers of resistance have also been identified for other antimalarial drugs, but some have not been found in Africa, such as the plasmepsin II gene (*Pfpm2*), implicated in the piperaquine susceptibility decrease. Recent studies have demonstrated the role of the PfCRT transporter, initially a marker of chloroquine resistance, in piperaquine resistance, and these mutations have also been found in a minority in French Guiana. However, therapeutic failures remain unexplained by our current knowledge, requiring us to investigate them and identify other resistance mechanisms.

This thesis focuses initially on the monitoring of resistance in Africa, with the study of the main molecular markers already identified, such as PfK13, or candidates such as the coronin gene (*Pfcoronin*), potentially involved in artemisinin resistance. We also investigated two therapeutic failures of the DHA-PPQ combination. The second part of this thesis focuses on the identification of a molecular marker of piperaquine resistance by selection pressure, in vitro. Two *Plasmodium falciparum* clones (*Pf3D7* and *PfW2*) were exposed to increasing piperaquine concentrations, up to 800 nM, during 28 and 22 months respectively. Their complete genomes were then analyzed using PromethION from Oxford Nanopore Technologies.

Our work has shown that mutations in the coronin gene, previously identified and validated by site-directed mutagenesis, do not appear to be involved in artemisinin treatment failures in Africa. Besides, the study of two therapeutic failures in travelers returning from Africa failed to identify a genetic cause. The early failure was due to a delayed clearance of parasites under artesunate treatment before the introduction of DHA-PPQ, probably due to the high initial schizontemia, while the late DHA-PPQ failure remained completely unexplained despite a wide investigation. Secondly, referent strains culture under piperaquine pressure did not generate resistance. However, a punctual adaptation of the parasites to their environment was observed. Indeed, one of the pressurized clones showed a PSA test survival rate of 20.5% in the absence of *PfCRT* mutations and plasmepsin II gene amplification. Moreover, the results of the "classic" chemosensitivity tests for this clone remain well below the resistance threshold.

All this work highlights the geographic specificity of the validated molecular markers for resistance to DHA and PPQ, and the need to better characterize isolates responsible for therapeutic failures in Africa. Furthermore, the culture of referent lab strains under piperazine drug pressure did not lead to phenotypic resistance nor genetic polymorphisms. Higher rates of piperazine or more prolonged drug exposure could be necessary.

Keywords : Dihydroartemisinin, Piperazine, *Plasmodium falciparum*, resistance, *Pfcoronin*, *PfK13*, Drug pressure, *in vitro*, Nanopore, WGS