Paludisme : épidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle, des voyageurs au territoire amazonien.

Lise Musset

▶ **To cite this version:**

Lise Musset. Paludisme : épidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle, des voyageurs au territoire amazonien.. Maladies infectieuses. Université de Guyane, 2020. tel-03430690v2

HAL Id: tel-03430690
https://hal.science/tel-03430690v2

Submitted on 8 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire

En vue de l'obtention de

Habilitation à Diriger des Recherches

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2020 par :

LISE MUSSET

Paludisme : épidémiologie, diagnostic, traitement, et contrôle, des voyageurs au territoire amazonien.

JURY

Frédéric ARIEY	PU-PH	Rapporteur
Françoise BENOIT-VICAL	DR	Rapporteure
Antoine BERRY	PU-PH	Rapporteur
Félix DJOSSOU	PU-PH	Examinateur
Sandrine HOUZE	PU-PH	Examinatrice
Mathieu NACHER	PU-PH	Examinateur
Magalie PIERRE-DEMAR	PU-PH	Tutrice

Ecole Doctorale n°587 : *Diversités, Santé et Développement en Amazonie*

En présence des maitres de la faculté,
des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure,

D'honorer ceux qui m'ont instruit *dans les préceptes de mon art*
et de leur témoigner reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, *ma profession avec conscience,*
et de respecter non seulement la législation en vigueur,
mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité
et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Serment de Galien

Remerciements

A Messieurs Jacques LE BRAS, David FIDOCK, André SPIEGEL
Professeurs et chercheurs dans le domaine du paludisme.

Pour m'avoir fait partager votre expérience scientifique et professionnelle,
Pour m'avoir accompagnée avec autant de confiance, de respect et d'humanité,
Pour avoir cru en moi,

Je vous dédie ce travail,
Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
et de mon plus profond respect.

Une fois n’est pas coutume,
Je souhaiterais présenter mes remerciements pour mes proches,
Car cette profession impose une perpétuelle remise en question,
Et peut être rude en jugements et objectifs fixés,
Sans un entourage bienveillant et soutenant,
Difficile de tenir la barre,

À ma famille,
Charly, Ysée, Yness, Yriss,
Pour votre soutien et votre amour qui me sont si précieux,
Charly, pour ton discernement et ta capacité à me ramener si souvent à l'essentiel,
Ysée, *Yness*, *Yriss*, vous êtes toute ma fièrté et n’oubliez jamais comme je vous aime,

À ma mère,
Pour ton amour, ta confiance, ton soutien,
Pour ton idéalisme qui nous pousse toujours plus loin,
Pour ton sens des valeurs,

Àmon père,
Pour ton amour, ta confiance et ton soutien,
Pour ta gentillesse et ta candeur,
Pour ton analyse du milieu professionnel,

À mes grands-parents, *Geneviève*, *Sabine*, *Robert* et *Jacques,*
Pour votre amour attentionné,
Pour votre dévouement exemplaire,
Pour tous les principes que vous m'avez transmis,
Pour votre soutien qui m’a permis de me construire,

À mes soeurs,
Pour votre amour et votre soutien,
Pour votre gentillesse et votre douceur,
Pour votre grande ouverture d’esprit,

À mes amis, *Warinah*, *Véronique*, *Violaine*, *Sophie*, *Caroline F*, *Caroline SP, Sarah*, *…*
Pour votre oreille attentive, qui écoute sans juger,
Pour votre soutien inconditionnel et vos conseils,

Au reste de la smala, *Claudette*, *Philippe*, oncles et tantes paternels, *Carine*…
Pour votre générosité, votre disponibilité et votre amour,

Une dédicace particulière à *Manon*,
Pour sa relecture attentive de ce document

Ce travail n’aurait pas été possible sans l’équilibre que vous m’apporté,
Je vous en suis très reconnaissante,
Merci du fond du cœur d'être là.

A ma tutrice, Madame Magalie PIERRE-DEMAR
Professeure, Université de Guyane,

Pour m'avoir accompagnée dans la construction de ce document,
Pour m’accorder sa confiance au fil de nos collaborations,

Aux Membres du Jury
Professeurs

Madame **Françoise BENOIT-VICAL**, rapporteure,
Monsieur **Frédéric ARIEY**, rapporteur,
Monsieur **Antoine BERRY**, rapporteur,
Madame **Sandrine HOUZE**,
Monsieur **Félix DJOSSOU**,
Monsieur **Mathieu NACHER**,

Pour avoir consacré une partie de votre temps à la critique de ce travail,
Pour m'avoir fait l'honneur de partager vos expériences et vos connaissances,

Trouvez ici l'expression de ma gratitude,
et de mon plus profond respect.

Aux membres successifs du laboratoire de parasitologie

Par ordre d'ancienneté,
Nicolle GUINGUINCOIN,
Béatrice VOLNEY,
Eric LEGRAND,
Yassamine LAZREK-SANDOT,
Luana MATHIEU,
Manon DISCOUR,
Olivier MORICEAU,
Catherine HALBOUT,
Célia FLORIMOND,
Maylis HUGHUIN,
Simon ROQUES,
Damien DONATO,
Jessica CASTERAS.

Pour votre précieuse contribution à ce travail,
Pour le plaisir de travailler avec vous au quotidien,
Pour votre disponibilité,
Pour votre implication,
Pour votre rigueur,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
Ce travail est aussi le vôtre.

A mes compagnons de galère,

Pour votre soutien permanent,
Pour votre écoute,
Pour ta relecture attentive,

Un jour c'est certain, les choses s'apaiseront,
et retrouveront sens et humanité,
Trouvez ici force et courage.

Aux chercheurs avec qui je collabore ou ai collaboré,

Emilie MOSNIER
Maylis DOUINE
Sachel MOK
Dan NEAFSEY
Jérôme CLAIN
Martha MAGRIS
Stephen VREDEN
Marc THELLIER
Bruno PRADINES
Marcus LACERDA
Lucie PALOQUE
Ivo MULLER
Didier MENARD
Socrates HERRERA
Et tant d'autres…

Pour votre rigueur scientifique, votre pertinence et votre disponibilité,
Sans collaboration la recherche n'est rien,

Aux jeunes scientifiques que j'ai eu la chance d'encadrer,

Un clin d'œil particulier à
Luana MATHIEU,
Léna BERTHELOT,
Christophe HEUGAS,
Mélanie TROUVAY,
Arielle SALMIER,
Sans oublier les autres,

Pour l'intérêt que vous avez porté à notre laboratoire et nos thématiques,
Pour votre implication dans nos projets partagés,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
Ce travail est aussi le vôtre.

Aux personnels des autorités sanitaires et programmes nationaux que j'ai pu côtoyer,

Organisation mondiale de la Santé,
Pascal RINGWALD,
Florence FOUQUE,

Organisation Panaméricaine de la Santé
Keither CARTER,
Maria-Paz ADE,
Prabjhot SINGH,
Roberto MONTOYA,
Rainier ESCALADA,

Direction Générale de la Santé
Bernadette WORMS,

Agence Régionale de Santé
Alice SANNA,
Jean-Marc FISHER,

Ministère de la santé du Guyana
Horace COX,

Programme national de lutte contre le paludime
Helen HIWAT, Suriname,
Paola MARCHESINI, Brésil,
Ana-Carolina SANTELLI, Brésil.

Pour votre confiance envers le laboratoire et l'expertise qu'il vous apporte,
Pour m'avoir fait l'honneur de partager vos expériences et vos attentes,
Pour avoir construit ensemble une vision partagée dans l'intérêt des populations,
Pour tous les moments de convivialité partagés aux quatre coins des Amériques,

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
et de mon plus profond respect.

Sommaire

Remerciements **3**

Sommaire **9**

Table des illustrations **10**

Curriculum vitae **11**

Etat civil 12
Fonctions 12
Statut professionnel 12
Formation initiale et diplômes 12
Publications scientifiques 13
Activités d'expertise 17
Organisation de conférences 19
Transmission de savoirs - Formation à la recherche 20
Diffusion de savoir auprès des professionnels de santé 22
Activités pédagogiques et d'enseignements, diffusion grand public 22
Financements obtenus 23
Participation aux jurys de concours 24
Société savante et organisation professionnelle 24
Communications scientifiques (hors expertise) 24

Résumé de mon parcours **29**

Activités de recherche **34**

COMPREHENSION ET DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTIPALUDIQUES 35
Résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone/proguanil : déterminants et évolution 39
Le gène *pfcrt* : marqueur de résistance à la chloroquine mais pas que…. 43
Résistance aux dérivés de l'artémisinine, REAGIR si l'histoire se répète 49

ETUDE DE *PLASMODIUM VIVAX* EN GUYANE 56
Evaluation de la prévalence des mutations des gènes *pvdhfr* et *pvdhps* en Guyane 57
Génotype *pvmdr1* et résistance de *Plasmodium vivax* à la chloroquine en Guyane 57
Efficacité thérapeutique de la chloroquine de *Plasmodium vivax* en Guyane entre 2009 et 2015 58
Etude de la diversité génétique de *P. vivax* en Guyane 58

UNE RECHERCHE OPERATIONNELLE AU SERVICE DU CONTROLE DU PALUDISME 61
Performances des méthodes de diagnostic utilisées dans le cadre de la prise en charge du paludisme 61
Caractérisation des zones de transmission guyanaises et actions 65

SYNTHESE DES PERSPECTIVES 76

Compétences transversales **79**

Surveillance et expertise en santé publique 80
Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires 81
Administration de la recherche 83
Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire 84
Conseillère en radioprotection 85
Encadrement d'équipe et management 86

Mise en perspective de mon parcours **87**

Bibliographie **89**

Annexes **92**

Table des illustrations

Figure 1. Présentation synthétique de mon parcours. 31
Figure 2. Cycle de développement de *Plasmodium falciparum,* charge parasitaire et antipaludiques. 36
Figure 3. Emergence et dispersion de la résistance à la chloroquine chez *Plasmodium falciparum*..... 38
Figure 4. Réseau haplotypique des génomes mitochondriaux sensibles et résistants à l'atovaquone. 41
Figure 5. Principe du modèle utilisé. 42
Figure 6. Mutations PfCRT impliquées dans la résistance à la chloroquine ou à la pipéraquine. 43
Figure 7. Impact de la séquence AttB sur l'expression du gène *pfcrt* marqué à la GFP. 44
Figure 8. Sensibilité *in vitro* à la chloroquine de 3D7, D10 et GCO3 exprimant l'haplotype *pfcrt* 7G8. 45
Figure 9. Réversion de la résistance à la chloroquine en Guyane, caractérisation et temporalité. 46
Figure 10. Répartition de *pfcrt* C350R en Amazonie. 47
Figure 11. Mutation *pfk13* C580Y au Guyana, 2016-2017, répartition (A) et origine (B). 51
Figure 12. Caractérisation des mutants *pfk13* C580Y, Guyana, 2016-2017. 52
Figure 13. Distribution des mutations *pfk13* en Amazonie. 53
Figure 14. Mouvement des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*, entre le lieu pontentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018. 54
Figure 15. Nombre de cas de paludisme recensés en Guyane entre 1998 et 2018. 56
Figure 16. Analyses bayésienne et en composante principale. 59
Figure 17. Prévalence des délétions du gène *pfhrp2* et *pfhrp3* sur le plateau des Guyanes, 2014-2018. 62
Figure 18. Prévalence du portage à *Plasmodium spp.* chez les orpailleurs travaillant en Guyane, 2015. 67
Figure 19. Antonio do Brinco à la frontière entre le Suriname et la Guyane, lieu de distribution de Malakit. ... 69
Figure 20. Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018. 71
Figure 21. Prévalence par PCR de *Plasmodium spp.*, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018. 72
Figure 22. Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017. 73
Figure 23. Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017. 73
Figure 24. Caractérisation de l'épidémie de paludisme, St Georges de l'Oyapock, 2017. 75
Figure 25. Exhaustivité du recrutement du CNR paludisme (a) et son réseau de partenaires guyanais (b). ... 81
Figure 26. Cartographie des collaborateurs du laboratoire de parasitologie en Guyane et à l'international. ... 82
Figure 27. Nombre de projets annuels et montants associés (hors subvention MESR). 83

Tableau 1. Diversité génétique parasitaire avant et après échec thérapeutique par atovaquone-proguanil. ... 40
Tableau 2. Allèles *pfcrt* observés en fonction de l'origine géographiques des isolats de *P. falciparum*. 43
Tableau 3. Tableau récapitulatif des perspectives de recherche en cours ou envisagées. 77

Curriculum vitae

Lise Musset

Etat civil

MUSSET Lise
Née le 7 mars 1978 à Reims (51)
Vie maritale, 3 enfants

Docteur en pharmacie
Docteur-ès-sciences

Fonctions

· Depuis 2020 **Pharmacienne biologiste réserviste**, Service de santé des Armées – Cayenne.

· Depuis 2017 **Co-coordinatrice** du **Centre National de Référence du paludisme**, **Pharmacienne biologiste, responsable**, Pôle Zones endémiques, Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· Depuis 2015 **Responsable** du **Laboratoire de parasitologie** – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· Depuis 2014 **Responsable** du **Centre Collaborateur OMS** pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· Depuis 2010 **Personne Compétente en Radioprotection** – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· 2012-2016 **Responsable** du CNR Paludisme, laboratoire associé pour la région Antilles-Guyane – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· 2010-2014 **Correspondante qualité** norme NF EN ISO 15189 Laboratoire de parasitologie – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· 2007-2014 **Responsable adjointe** Laboratoire de parasitologie – Institut Pasteur de la Guyane – Cayenne.

· 2006-2007 **Chercheuse associée** (Postdoctorante) – Laboratoire de David Fidock – Department of Microbiology and Medicine – Columbia University – New-York.
"Rôle de la protéine PfCRT dans la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques."

· 2000-2006 **Doctorante** – Ecole Doctorale du Médicament – Paris 5.
"Contribution à l'étude de la résistance de Plasmodium falciparum à l'atovaquone-proguanil."
Laboratoire de parasitologie-mycologie : CNR Paludisme / EA 209 Faculté de pharmacie – Paris.
Sous la direction du Pr Jacques Le Bras.

Statut professionnel

· Depuis 2016 **Chargée de recherche expert**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.

· 2010-2016 **Chargée de recherche**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.

· 2009-2010 **Assistant chargée de recherche**, cadre scientifique – Institut Pasteur – Paris.

· 2007-2009 **Cadre Administratif et Technique** – Institut Pasteur – Paris.

Formation initiale et diplômes

· 2011 **Personne Compétente en Radioprotection** – APAVE – Paris 17.

· 2007 **Post-doctorat** – Laboratoire de David Fidock – Department of Microbiology and Medicine – Columbia University – New-York.
"Rôle de la protéine PfCRT dans la résistance de Plasmodium falciparum aux antipaludiques."
Financement : Bourse Lavoisier du Ministère des Affaires Etrangères.

· 2006 **Doctorat Sciences de la vie** – Ecole Doctorale du Médicament – Paris 5.
"Etude de la résistance à l'atovaquone-proguanil chez Plasmodium falciparum : phénotype, génotype et mécanismes moléculaires impliqués."
Directeur : Pr. Jacques Le Bras.

Laboratoires : CNR Paludisme (Hôpital Bichat-Claude Bernard) – EA 209 "Eucaryotes unicellulaires pathogènes : transports membranaires et chimiorésistance" (Faculté de pharmacie Paris 5).
Financement : Allocation du ministère de la recherche.
Mention : Très Honorable avec félicitations du jury.

· 2003 **DIU du Centre Enseignement de la Statistique Appliquée à la Médecine** – Paris 6.
Option : statistiques appliquées à la biologie.
Mention : Bien.

· 2002 **Thèse d'Etat pour l'obtention du titre de Docteur en pharmacie** – Reims.
"Plasmodium falciparum : recherche et étude d'un polymorphisme dans le gène du cytochrome b *associé à la résistance* in vitro *à l'atovaquone."*
Mention : Très Honorable avec félicitations du jury.

· 2001 **DEA biologie, génétique et immunologie des infections parasitaires** – Paris 5.
"Etude de la résistance à l'atovaquone chez Plasmodium falciparum : phénotype, génotype et mécanismes moléculaires impliqués."
Directeur : Pr. Jacques Le Bras, Laboratoire : Centre National de Référence du Paludisme.
Rang 3/19, Mention : Bien.

· 2000 **Maîtrise de sciences biologiques et médicales** – Reims.
Composée de cinq certificats: Parasitologie générale et spécialisée (toxoplasmose) ; Physiopathologie des maladies transmissibles (VIH, *P. aeruginosa*, toxoplasmose) ; Biochimie générale (métabolismes et facteurs de transcription) et spécialisée (culture cellulaire).

· 1995 **Baccalauréat scientifique** option SVT – Lycée Félix Eboué – Cayenne.
Mention : assez bien.

Publications scientifiques

h-index 25, (Google scholar)

Tableau de synthèse des publications par positionnement au sein des auteurs et index de citation du journal

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
1er, 2ème auteur		**3**	**1**		**1**					**2**	**1**	**2**	**1**		**1**		**12**
		4,7	**9,9**		2,6					**4,3**	2,9	2,9	NR		**4,7**		
		0,6								2,7		2,7					
		2,8															
Auteur associé						**1**		**3**	**3**	**2**	**6**	**6**	**1**	**1**	**1**	**5**	**29**
						8,1		9,4	4,4	6,1	4,4	10,2	3,0	2,7	NR	4,4	
								4,5	3,5	8,2	2,9	7,4	2,5			0,9	
								2,7	4,0		2,9	79,7				0,4	
											2,9	1,5				NR	
											2,9	3,4				ND	
											5,2	6,2					
Avant dernier					**1**								**2**			**1**	**4**
					NR								2,7			2,6	
Dernier auteur									**1**		**1**		**1**	**1**		**2**	**6**
									4,4		**9,7**		**NR**	**4,9**		**2,3**	
																7,6	
Total		**3**	**1**	**0**	**2**	**1**	**0**	**3**	**4**	**4**	**8**	**8**	**5**	**2**	**2**	**8**	**51**

En violet figurent mes publications en premier ou dernier auteur. NR: non référencé en termes de facteur d'impact, ND: non déterminé.

45· Saldanha R, Mosnier E, Barcellos C, Carbunar A, Charron C, Desconnets JC, Guarmit B, Do Socorro Mendonça Gomes M, Mandon T, Martins Mendes A, Peiter PC, **Musset L**, Sanna A, Van Gastel B, Roux E. Contributing to elimination of cross-border malaria through a standardized solution for case surveillance, data sharing, and data interpretation: development of a cross-border monitoring system. *JMIR Public Health Surveill*, **2020**;6(3):e15409. doi: 10.2196/15409. PubMed PMID: 32663141.

· Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, **Musset L**, Roux E. Resurgence risk for malaria, characterization of a recent outbreak in a Amazonian border area French Guiana/Brazil. *BMC Infect dis*, **2020**;20(1):373. doi: 0.1186/s12879-020-05086-4. PubMed PMID: 32456698; PMCID: PMC7249302. *IF n-1: 2.58*

· Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. Local emergence and clonal propagation in eastern Amazonia of *Plasmodium falciparum k13* C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*, **2020**;9:e51015. doi: 10.7554/eLife.51015. PubMed PMID: 32394893; PMCID: PMC7217694. *IF n-1: 7.55.*

· Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Acuña Hidalgo B, Durand P, Houze S, Berry A, Zakeri S, Haque R, Shafiul Alam M, Nosten F, Severini C, Gebru Woldearegai T, Mordmüller B, Kremsner PG, González-Cerón L, Fontecha G, Gamboa D, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Pumpaibool T, Harnyuttanakorn P, Lekweiry KM, Mohamad Albsheer M, Mahdi Abdel Hamid M, Boukary AOMS, Trape JF, Renaud F, Prugnolle F. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl Trop Dis*, **2020**;14(3):e0008072. doi: 10.1371/journal.pntd.0008072. PubMed PMID: 32150544; PMCID: PMC7082039. *IF n-2: 4.40.*

· Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Moriceau O, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, Demar M, Odonne G, Douine M, Michaud C, Pelleau S, Djossou F, **Musset L**. Prevalence of *Plasmodium spp*. in the Amazonian border context (French Guiana-Brazil): Associated factors and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*, **2020**;102(1):130-41. doi: 10.4269/ajtmh.19-0378. PubMed PMID: 31769403; PMCID: PMC6947805. *IF n-1: 2.25.*

40· **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. Emergence of *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2019**;63(11):e02116-18. doi: 10.1128/AAC.02116-18. PubMed PMID: 31481442; PMCID: PMC6811453. *IF n: 4.68.*

· Kendjo E, Houzé S, Mouri O, Taieb A, Gay F, Jauréguiberry S, Tantaoui I, Ndour PA, Buffet P, Piarroux M, Thellier M, Piarroux R for the French Imported Malaria Study Group. Epidemiologic trends in malaria incidence among travelers returning to metropolitan France, 1996-2016. *JAMA Network Open*, **2019**. 2(4): e191691. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.1691. PubMed PMID: 30951158; PMCID: PMC6523451.

· Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. Malakit: an innovative pilot project to self-diagnose and self-treat malaria among illegal gold miners in the Guiana Shield. *Malar J*, **2018**;17(1):158 doi: 10.1186/s12936-018-2306-5. PubMed PMID: 29631588; PMCID: PMC5892004. *IF n+2: 2.71.*

· Douine M, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, **Musset L**. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in French Guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2018**;73(1):231-9. doi: 10.1093/jac/dkx343. PubMed PMID: 29045645. *IF n+2: 4.94.*

· Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, Adenis A, Lazrek Y, Niemetsky F, Aucouturier AL, Demar M, **Musset L**, Nacher M. Illegal gold miners in French Guiana : a neglected population with poor health. *BMC Public Health*, **2017**;18(1):23. doi: 10.1186/s12889-017-4557-4. PubMed PMID: 28716015; PMCID: PMC5513330. *IF n+2: 2.70.*

35· Mosnier E, Douine M, Epelboin L, Pelleau S, Pommier de Santi V, Dangel Y, Demar M, Mutricy R, Guarmit B, Nacher M, Brousse P, Davy D, Djossou F, **Musset L**. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *vivax* infection in the neighborhood of Blondin, Saint-Georges-de-l'Oyapock District, French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot*, **2017**;110(4):265-9. doi: 10.1007/s13149-017-0572-z. PubMed PMID: 2892395.

· Rougeron V, Tiedje KE, Chen DS, Rask TS, Gamboa D, Maestre A, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Yalcindag E, Renaud F, Prugnolle F, Day KP. Evolutionary structure of *Plasmodium falciparum* major surface antigen genes in South America: Implications for epidemic transmission and surveillance. *Ecol Evol*, **2017**;7(22):9376-90. doi: 10.1002/ece3.3425. PubMed PMID: 29187985; PMCID: PMC5696401. *IF n+2: 2.54.*

· Leba LJ, Popovici J, Estevez Y, Pelleau S, Legrand E, **Musset L**, Duplais C. Antiplasmodial activities of dyes against *Plasmodium falciparum* asexual and sexual stages: Contrasted uptakes of triarylmethanes Brilliant green, Green S (E142), and Patent Blue V (E131) by erythrocytes. *Int J Parasitol Drugs Drug resist*, **2017**;7(3):314-20. doi: 10.1016/j.ijpddr.2017.07.002. PubMed PMID: 28886443; PMCID: PMC5587875. *IF n+1: 3.02.*

· Gabryszewski SJ, Dhingra SK, Combrinck JM, Lewis IA, Callaghan PS, Hassett MR, Siriwardana A, **Musset L**, Smith PJ, Llinás M, Egan TJ, Roepe PD, Fidock DA. Evolution of fitness cost-neutral mutant PfCRT conferring *P. falciparum* 4-aminoquinoline drug resistance is accompanied by altered digestive vacuole physiology and reduced metabolic stress. *PLOS Pathogens*, **2016**;12(11):e1005976. doi: 10.1371/journal.ppat.1005976. PubMed PMID: 27832198; PMCID: PMC5104409. *IF n+2: 6.18.*

· Faway E, **Musset L**, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, Legrand E. *Plasmodium vivax* multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*. **2016**;15(1):540. doi: 10.1186/s12936-016-1595-9. PubMed PMID: 27825387; PMCID: PMC5101641. *IF n+2: 2.71.*

30· Rahman R, Martin MJ, Persaud S, Ceron N, Kellman D, **Musset L**, Carter KH, Ringwald P. Continued Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Artemisinin in Guyana, With Absence of Kelch Propeller Domain Mutant Alleles. **2016**. *Open Forum Infect Dis*;3(3):ofw185. doi: 10.1093/ofid/ofw185. PubMed PMID: 27704030; PMCID: PMC5047421. *IF n+3: 3.37.*

· Gomes MD, Vieira JL, Cassiano GC, **Musset L**, Legrand E, Nacher M, Couto VS, Machado RL, Couto AA. Evaluation of circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* to estimate its prevalence in Oiapoque, Amapá state, Brazil, bordering French Guiana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo,* **2016**;58:72. doi: 10.1590/S1678-9946201658072. PubMed PMID: 27680177; PMCID: PMC5048643. *IF n+2: 1.49.*

· Menard D, Nimol K, Beghain J, Adegnika A, Kremsner P, Ramharter M, Fandeur T, Sirima S, Houzé S, Djallé D, Vigan-Womas I, Randrianarivelojosia M, Sutherland C, Leelawong M, Herrera S, Laminou I, Silué K, Cui L, Syafruddin D, Boum Y, Ferreira-da-Cruz MF, Lacerda M, Pradines B, Collet L, Fall B, Tahar R, Toure O, Dieye A, **Musset L**, Kano S, Jiang L, Cao J, Chen JH, Zakeri S, Sattabongkot J, Niaré K, Noedl H, Fuehrer HP, Berry A, Menard S, Eboumbou Moukoko C, Morlais I, Espino FE, Mazarati JB, Na-Bangchang K, Nambozi M, Muhindo Mavoko H, Barnadas C, Wini L, Alemu A, Khan W, Shafiul Alam M, Lin Hua T, Lin Hua T, Jahirul Karim M, Phuc BQ, Lin K, Rahim Awab G, Das Thakur G, Khanthavong M, Sheikh Omar A, Warsame M, Bustos M, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, **Legrand E**, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock D, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O. A worldwide map of Plasmodium *P. falciparum* artemsinin resistance. *New England J Med*, **2016**; 374(25):2453-64. doi: 10.1056/NEJMoa1513137. PubMed PMID: 27332904; PMCID: PMC4955562. *IF n+2: 79.73.*

· Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Pasuier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, Demar M, Nacher M. Prevalence of *Plasmodium spp*. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*, **2016**;15:315. doi: 10.1186/s12936-016-1367-6. PubMed PMID: 27277831; PMCID: PMC4899929. *IF n+2: 2.85.*

· Pommier de Santi V, Djossou FC, Barthes N, Bogreau HC, Hyvert G, Nguyen C, Pelleau SC, Legrand E, **Musset L**, Nacher M, Briolant SC. Malaria hyperendemicity and risk for artemisinin resistance among illegal gold miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis*, **2016**;22(5):903-6. doi: 10.3201/eid2205.151957. PubMed PMID: 27089004; PMCID: PMC4861531. *IF n+2: 7.42.*

25· Gabryszewski SJ, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial genetic modeling of *pfcrt*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, **2016**;33(6):1554-70. doi: 10.1093/molbev/msw037. PubMed PMID: 26908582; PMCID: PMC4868112. *IF n+2: 10.22.*

· Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalall K, Ceron N, **Musset L**, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. Independent Emergence of the *Plasmodium Falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis*. **2015**. 213: 1472-1475. doi: 10.1093/infdis/jiv752. PubMed PMID: 26690347. *IF n+2: 5.19.*

· Ginouves M, Veron V, **Musset L**, Legrand E, Stefani A, Prevot G, Demar M, Djossou F, Brousse P, Nacher M, Carme B. Frequency and distribution of mixed *Plasmodium falciparum-vivax* infections in French Guiana between 2000 and 2008. *Malar J*. **2015**;14:446. doi: 10.1186/s12936-015-0971-1. PubMed PMID: 26555553; PMCID: PMC4641342. *IF n+2: 2.85.*

· Gomes MS, Vieira JL, Machado RL, Nacher M, Stefani A, **Musset L**, Legrand E, Menezes RA, Júnior AA, Sousa AP, Couto VS, Couto ÁA. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J*. **2015**. 14: 402. doi: 10.1186/s12936-015-0925-7. PubMed PMID: 26453152; PMCID: PMC4600333. *IF n+2: 2.85.*

· Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel *pfcrt* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**;112(37):11672-77. doi: 10.1073/pnas.1507142112. PubMed PMID: 26261345; PMCID: PMC4577156. *IF n+2: 9.66.*

20· Mura M, Briolant S, Donato D, Volney B, Pelleau S, **Musset L**, Legrand E. Absence of correlation between *ex vivo* susceptibility to doxycycline and *pfteQ-pfmdt* gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*, **2015**;14:286. doi: 10.1186/s12936-015-0788-y. PubMed PMID: 26206143; PMCID: PMC4513625. *IF n+2: 2.85.*

· Leba LJ, **Musset L**, Pelleau S, Estevez Y, Birer C, Witkowski B, Menard D, Delves MJ, Legrand E, Duplais C, Popovici J. Use of *Plasmodium falciparum* culture-adapted field isolates for *in vitro* exflagellation-blocking assay. *Malar J*, **2015**;14:234. doi: 10.1186/s12936-015-0752-x. PubMed PMID: 26040313; PMCID: PMC4464717. *IF n+2: 2.85.*

· Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, **Musset L**, Legrand E, Faust A, Baniecki ML, Ndiaye D, Daniels RF, Hartl DL, Sabeti PC, Wirth DF, Volkman SK, Neafsey DE. COIL: a methodology for evaluating

malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*, **2015**;14:4. doi: 10.1186/1475-2875-14-4. PubMed PMID: 25599890; PMCID: PMC4417311. *IF n+2: 2.85.*

· Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, Hamilton E, Ferreira MU, Karunaweera ND, Serre D, Zimmerman PA, Sa JM, Wellems TE, **Musset L**, Legrand E, Melnikov A, Neafsey DE, Volkman SK, Wirth DF, Sabeti PC. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl Trop Dis,* **2015**;9(3):e0003539. doi: 10.1371/journal.pntd.0003539. PubMed PMID: 25781890; PMCID: PMC4362761. *IF n+2: 4.37.*

· Khim N, Andrianaranjaka V, Popovici J, Kim S, Ratsimbasoa A, Benedet C, Barnadas C, Durand R, Thellier M, Legrand E, **Musset L**, Menegon M, Severini C, Nour BY, Tichit M, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. Effects of mefloquine use on *Plasmodium vivax* multidrug resistance. *Emerg Infect Dis*, **2014**;20(10):1637-44. doi: 10.3201/eid2010.140411. PubMed PMID: 25272023; PMCID: PMC4193276. *IF n+2: 8.22.*

15· Cottrell G, **Musset L**, Hubert V, Le Bras J, Clain J. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents Chemother*, **2014**;58(8):4504-14. doi: 10.1128/AAC.02550-13. PubMed PMID: 24867967; PMCID: PMC4136057. *IF n+2: 4.30.*

· Yalcindag E, Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Brisse S, Diancourt L, Aubouy A, Becquart P, d'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Maestre A, Menard D, **Musset L**, Noya O, Veron V, Wide A, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala F, Renaud F, Prugnolle F. Patterns of selection on *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigens after the colonisation of the New World. *Mol Ecology*, **2014**;23(8) :1979-93. doi: 10.1111/mec.12696. PubMed PMID: 24834503. *IF n+2: 6.09.*

· Menard D, Chan ER, Benedet C, Ratsimbasoa A, Kim S, Chim P, Do C, Witkowski B, Durand R, Thellier M, Severini C, Legrand E, **Musset L**, Nour BYM, Mercereau-Puijalon O, Serre D, Zimmerman PA. Whole genome sequencing of field isolates reveals a common duplication of the duffy binding protein gene in Malagasy *Plasmodium vivax* strains. *PLOS Neglect Trop Dis*, **2013**;7(11):e2489. doi: 10.1371/journal.pntd.0002489. PubMed PMID: 24278487; PMCID: PMC3836732. *IF n+2: 3.95.*

· Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B , **Musset L**. High performances of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *PLOS One*, **2013**;8(9):e74269. doi: 10.1371/journal.pone.0074269. PubMed PMID: 24086328; PMCID: PMC3781074. *IF n+2: 4.41.*

· Stefani A, Dusfour I, Corrêa AP, Cruz MC, Dessay N, Galardo AK, Galardo CD, Girod R, Gomes MS, Gurgel H, Lima AC, Moreno ES, **Musset L**, Nacher M, Soares AC, Carme B, Roux E. Land cover, land use and malaria in the Amazon: a systematic literature review of studies using remotely sensed data. *Malaria J*, **2013**;12:192. doi: 10.1186/1475-2875-12-192. PubMed PMID: 23758827; PMCID: PMC3684522. *IF n+2: 3.49.*

10· Woodrow CJ, Dahlström S, Cooksey R, Flegg JA, Le Nagard H, Mentré F, Murillo C, Ménard D, Nosten F, Sriprawat K, **Musset L**, Quashie NB, Lim P, Fairhurst RM, Nsobya SL, Sinou V, Noedl H, Pradines B, Johnson JD, Guerin PJ, Sibley CH, Le Bras J. High-throughput analysis of antimalarial susceptibility data by the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) *in vitro* analysis and reporting tool. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**;57(7):3121-30. doi: 10.1128/AAC.02350-12. PubMed PMID: 23612201; PMCID: PMC3697366. *IF n+2: 4.42.*

· Berger F, Flamand C, **Musset L**, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, Dusfour I, Legrand E, Ardillon V, Rabarison P, Grenier C, Girod R. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saül, French Guiana, January-April 2009. *Am J Trop Med Hyg*, **2012**;86(4):591-7. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0582. PubMed PMID: 22492141; PMCID: PMC3403779. *IF n+2: 2.70.*

· Legrand E, Yrinesi J, Ekala MT, Peneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, **Musset L**, Meynard JB, Puijalon O. Discordant temporal evolution of *Pfcrt* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after changing drug policy in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**;56(3):1382-9. doi: 10.1128/AAC.05280-11. PubMed PMID: 22232280; PMCID: PMC3294927. *IF n+2: 4.48.*

· Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson T, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau H, Carnevale P, d'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestrel A, Mayxay M, Ménard D, **Musset L**, Newton PN, Nkoghé D, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Legrand E, Chevillon C, Ayala FJ, Renaud F, Prugnolle F. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *PNAS*, **2012**;109(2):511-6. doi: 10.1073/pnas.1119058109. PubMed PMID: 22203975; PMCID: PMC3258587. *IF n+2: 9.42.*

· Valderramos S, Valderrramos JC, **Musset L**, Purcell L, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock D. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Path*. **2010**;6(5):e1000887. doi: 10.1371/journal.ppat.1000887. PubMed PMID: 20485514; PMCID: PMC2869323. *IF n+2: 8.14.*

5· Berger F, Girod R, Grenier C, Djossou F, Rosine J, Ardillon V, Ruello M, Sanquer MA, Besançon L, **Musset L**, Flamand C. Recrudescence de paludisme à Saül, Guyane, 2008. *BVS Antilles-Guyane*, **2009**;11:2-4.

· Barnadas C, **Musset L**, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, Rogier C, Bouchier C, Picot S, Ménard D. High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax* dhfr/dhps mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*, **2009**;81(1):19-22. doi: 10.4269/ajtmh.2009.81.19. PubMed PMID: 19556560. *IF n+2: 2.59.*

· **Musset L**, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, **2007**;24(8):1582-5. doi: 10.1093/molbev/msm087. PubMed PMID: 17488741. *IF n+2: 9.87.*

· **Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect*, **2006**;8(11):2599-604. doi: 10.1093/jac/dkx431. PubMed PMID: 16962361. *IF n+2: 2.80.*

1· **Musset L**, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother*, **2006**. 57(1):110-5. doi: 10.1093/jac/dki420. PubMed PMID: 16319183. *IF n+2: 4.716.*

Revues

· Mosnier E, Garancher L, Galindo M, Djossou, FM, Moriceau O, Hureau-Mutricy L, Silva Barbosa R, Lambert Y, Lazrek Y, **Musset L**, Douine M. Paludisme en Guyane : des projets de recherche opérationnelle originaux s'appuyant sur la santé communautaire. *La lettre de l'infectiologue*, **2020**;35(2): 50-7. Accessible en ligne.

R5· Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. doi: 10.1007/s40475-020-00202-5. *IF n-2: 0.92.*

· Thellier M, Simard F, **Musset L**, Cot M, Velut G, Kendjo E, Pradines B. Changes in malaria epidemiology in France and worldwide, 2000-2015. *Med Mal Infect*, **2020**;50:99-112. doi: 10.1016/j.medmal.2019.06.002. PubMed PMID: 31257063. *IF n-2: 0.38.*

· Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. doi: 10.1007/s40475-020-00202-5. *IF n-2: 0.92.*

· **Musset L**, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, Gomes MSM, Djossou F, Legrand E. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2014**;109(5):525-33. doi: 10.1590/0074-0276140031. PubMed PMID: 25184998; PMCID: PMC4156445. *IF n+2: 2.67.*

R1· Le Bras J, **Musset L**, Clain J. [Antimalarial drug resistance]. *Med Mal Infect*, **2006**;36(8):401-5. Epub 2006/07/21. doi: 10.1016/j.medmal.2006.05.005. PubMed PMID: 16854546. *IF n+2: 0.62.*

Activités d'expertise

Auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et Organisation Panaméricaine de la santé (OPS)

· **2019**. *68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20-24th, National Harbor (USA). Conference title: A PAHO/WHO collaborating center perspective: efforts and partnerships to control and interpret laboratory-based drug resistance information to support malaria elimination.

· **2019**. *Evolving artemisinin resistance workshop*, 17-19th November, Washingtown DC (USA).

· **2019**. *Regional meeting on malaria in mobile migrant populations*, 29-31st October, Paramaribo (Suriname).

· **2019**. *Meeting on malaria elimination in South America*, 12-14th August, Manaus (Brazil). Invited conference: Results of the support of the Collaborating Centers.

· **2019**. *Supervisory visit, therapeutic efficacy study*, 9-11th April, Georgetown and Port Kaituma (Guyana).

· **2018**. *Malaria project managers' meeting*, 14-16th November, Washington DC (USA). Invited conference: Situation of global resistance to antimalarials in the region.

· **2017**. *Meeting on malaria elimination of* P. falciparum *malaria: detection, treatment, and surveillance of cases*, 16-18th May, Lima (Peru). Invited conference: Situation of artemisinin resistance in Guyana: update from the *pfk13* gene as a molecular marker.

· **2016**. *Technical consultations on WHO prequalification requirements for* in vitro *diagnostics (IVDs) to detect G6PD déficiency*. 26-28th September, Geneva (Switzerland).

· **2016**. *Guyana Shield meeting on the implementation of the framework for artemisinin resistance prevention, containment, and elimination in South America*. 12-14th July, Paramaribo (Suriname).

· **2016**. *XV Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 3-5th May, Bogota (Colombia). Invited conference: Molecular marker and resistance surveillance in South America: inputs from WHO CC form surveillance of antimalarial drug resistance.

· **2015**. *Inaugural Meeting of the Malaria Technical Advisory Group of PAHO*, 8-9th October, Punta Cana (Dominican Republic). Observer.

· **2015**. *PAHO Regional Consultation Meeting on the Strategy and Plan of Action for Malaria in the Americas 2016-2020*, 6-7th March, Punta Cana (Dominican Republic). One invited conference: Malaria resistance surveillance on the Guiana Shield.

· **2015**. *XIV Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 24-26th March, Rio de Janeiro (Brésil). Invited conference: Current situation of resistance to antimalarial drugs in Amazonia: Past and current drugs.

· **2015**. *PAHO Regional Technical Review Panel (TRP) for Global Fund Malaria Concept Notes*, 17-19th March, Washington DC (USA). Musset L.: Review of the Concept note for Haiti.

· **2014**. *PAHO Meeting for the Guiana Shield and Regional consultation of the action plan for the containment and elimination of resistance to artemisinin derivatives in South A*merica", 11-13 novembre, Paramaribo (Suriname). Two invited conferences: i) Monitoring antimalarial therapeutic efficacy: issues, challenges and strategic approaches. ii) Drug efficacy and resistance level of artemisinin derivatives and partner drugs in French Guiana.

· **2014**. *PAHO Technical Consultation on Plasmodium vivax in the Americas,* 5th March, Panama city (Panama).

· **2014**. *PAHO/AMRO Consultation on the Global Malaria Action Plan 2016-2025 (GMAP 2),* 3-4th March, Panama city (Panama).

· **2014**. *PAHO/AMRO Regional Consultation on the Global Technical Strategy 2016-2025 (GTS),* 1-2nd March, Panama city (Panama).

· **2014**. *XIII Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 11-13th March, Managua (Nicaragua). One invited conference: Malaria resistance monitoring.

· **2013**. *Malaria Research Agenda, PAHO meeting*, 11-12 novembre, Washington (USA). One presentation: Knowledge building effort in French Guiana.

· **2012**. *XI Reunión Anual de Evaluación de AMI/RAVREDA*, 19-23th March, Antigua (Guatemala).

· **2010**. *Séminaire de coopération technique pour la prévention du paludisme*, 7-9 juin, Cayenne (Guyane). Two invited conferences: i) Chimiorésistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* en Guyane ; ii) Evaluation des TDR en Guyane.

Auprès de l'Agence Région de Santé de Guyane

· **2019**. Elaboration *Plan régional de lutte contre le paludisme 2019-2025.*

· **2018**. *Comité de suivi du plan de lutte contre le paludisme en Guyane,* 13 septembre, Cayenne. CNR Paludisme/CC OMS : activités de recherche au service de la santé publique guyanaise.

· **2017**. *Rencontre d'échanges, Plan de lutte contre le paludisme en Guyane,* 7 mars, Cayenne. Laboratoire de parasitologie : activités, résultats et perspectives dans le cadre de la lutte contre le paludisme.

· **2017**. *CEMCE,* 10 février, Cayenne. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines?

· **2014-2015**. *Plan régional de lutte contre le paludisme 2015-2018.* Coordination des groupes d'experts sur les questions du diagnostic et de la prise en charge. Participation aux groupes s'intéressant au diagnostic et à l'épidémiologie.

Auprès du Haut Conseil de la Santé Publique

· **2019**. Audition auprès du groupe de travail visant à évaluer l'état de la santé en Guyane.

· **2018**. Participation au groupe de travail visant à évaluer l'intérêt de l'utilisation de la primaquine à visée « altruiste » contre *Plasmodium falciparum* dans les zones de forêt à l'intérieur de la Guyane et à visée anti-hypnozoitaire contre *P. vivax* en France en général.

Auprès de SPILF

· **2017**. Mise à jour des recommandations de prose en charge et prévention du paludisme d'importation en France continentale. Participation au groupe de travail sur l'épidémiologie.

Membre de comité scientifique

· **Depuis 2017**. Conseil scientifique du Labex CEBA, Centre d'Etude pour la Biodiversité Amazonienne. Coordination : Jérôme Chave, CNRS Guyane.

· **2014-2016**. Comité scientifique du projet ORPAL, prévalence du portage de Plasmodium chez les personnes travaillant sur les sites d'orpaillage clandestin en Guyane française. Coordination : Dr Maylis Douine, CIC Guyane.

· **2014-2015**. Comité scientifique du projet KARMA, K-13 Artemisinin Resistance Multicentre rapid Assessment. Coordination : D. Ménard, IP Cambodge.

· **2010-2011**. Comité scientifique groupe *in vitro* du réseau WorldWide Antimalarial Resistance Network (Bill & Melinda Gates Fondation).

Expertise d'articles

· **Depuis 2010**. Référé pour les journaux internationaux (entre autres) : Clinical Infectious Disease, Acta Tropica, Malaria Journal, PLOS NTD, AAC….

Autres sollicitations

· **2014**. *Paludisme à* Plasmodium falciparum *: place des dérivés de l'artémisinine.* Expertise et relecture avisée pour ce numéro spécial des Dossiers du CNHIM (Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament). Décembre 2014, XXXV, 6.

Organisation de conférences

· **2020**. 1ères journées guyanaises d'infectiologie, Février, Cayenne (Guyane).

· **2020**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 28 janvier, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme en Guyane, vers l'élimination ?, ii) PALUSTOP : bilan chiffré et outils d'éducation à la population, perspectives en milieu scolaire, iii) Echecs de l'Eurartesim® en Guyane : caractérisation et impact.

· **2019**. CoChair. Antimalarial Efficacy Monitoring in the Americas: The Way Forward As We Move Towards Elimination. *68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20-24th, National Harbor (USA).

· **2018**. CoChair. How to monitor drug resistance and assess the spread of resistant populations? *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).

· **2018**. CoChair. Scientific session 20 Malaria chemotherapy and drug resistance, *67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).

· **2018**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme sud-américain : contexte, situation épidémiologique et recherche opérationnelle, ii) Malakit : une étude pilote innovante face à la situation complexe de la transmission du paludisme sur les sites d'orpaillage, iii) REAGIR face a la résistance aux ACTs sur le plateau des Guyanes, acte 1 : résistance à l'artémisinine au Guyana.

· **2017**. CoChair. Late breakers turbo talks. *6th International Conference of Plasmodium vivax research,* 11-14th June, Manaus (Brazil).

· **2016**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines? ; ii) Efficacité thérapeutique de la chloroquine en Guyane 2009 - 2015

· **2014**. Malaria transmission and treatment ; Monitoring malaria resistance. *Amazonian Conference on Emerging and Infectious Diseases,* 26th-28th September 2014, Cayenne (Guyane).

· **2014**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 18 décembre, Paris. Deux présentations : i) Evolution de la résistance de *P. falciparum* en zone de faible transmission : réversion de la résistance à la chloroquine par acquisition d'une nouvelle mutation ; ii) Laboratoire associé Antilles-Guyane : Données 2013 et activités 2014.

· **2013**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 17 décembre, Paris (France). Trois présentations : i) Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2012, tendances 2013 ; ii) Phénotypage vis-à-vis des dérivés de

l'artémisinine : présentation du test RSA ; iii) Traitement par primaquine en Amérique du Sud : recommandations OMS et pratiques.

· **2012**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris (France). Une présentation : Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2011, tendances 2012.

Transmission de savoirs - Formation à la recherche

Diffusion de savoir auprès des étudiants

Tableau de synthèse des encadrements effectués

	2005	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Post-doctorant						1						1	1	**3**
Thèse de sciences										1*				**1**
Thèse d'exercice								1	1					**2**
Master	1			1	2		1	1-1*		1*	1*	1*	1	**11**
Ingénieur		1	1					1*	1*					**4**
Licence			2	1			1		1			1		**6**
BTS								1*	1*	1*		1*		**4**
Collégiens											1	1		**2**
Total	**1**	**1**	**3**	**2**	**2**	**1**	**2**	**5**	**4**	**3**	**2**	**5**	**2**	**33**

**co-encadrement*

Post-doctorant

. Mme Célia Florimond. *Résistance de* P. falciparum *à la pipéraquine*: *émergence et dispersion sur le plateau des Guyanes*. Septembre 2019 – Décembre **2021**.

. Mme Arielle Salmier. *Diversité génétique et dynamique de* P. vivax *en Guyane* : *évolution depuis 10 ans et impact des épidémies*. Janvier – Octobre **2019**.

. M Stéphane Pelleau. Résistance de *P. falciparum* aux lysosomotropes, dynamique et évolution des plasmodies au cours du temps. Juin **2012** – Octobre **2014**.

Thèse de sciences

. Mme Luana Mathieu. Université de Guyane, Doctorante. *Résistances de* P. falciparum *aux associations à base de dérivés de l'artémisinine : caractérisation et épidémiologie sur le plateau des Guyanes*. Janvier **2017** - Décembre **2020**. Co-encadrée par Lise Musset et Pr Magalie Demar.

Thèse d'exercice, mémoires de DES, Internes en biologie médicale

. Mme Léna Berthelot. DES de biologie médicale, thèse d'exercice de médecine. Université des Antilles-Guyane, 7ème semestre. *Prévalence des délétions des gènes* pfhrp2 *et* pfhrp3 *chez* Plasmodium falciparum *sur le plateau des Guyanes.* Novembre **2016** - Avril **2017**. Six mois. Soutenance de thèse d'exercice en médecine et mémoire de DES de biologie médicale : 23 avril 2018 Université des Antilles.

. M Christophe Heugas. DES de biologie médicale, thèse d'exercice de médecine. Université de Poitiers, 6ème semestre. *Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement de* P. vivax *en Guyane*. Novembre **2015** - Avril **2016**. Six mois. Soutenance de thèse d'exercice en médecine et mémoire de DES de biologie médicale : 20 septembre 2016 Université de Poitiers.

Master – Etudiants en pharmacie

. Mme Solène Blin. 5ème année de medecine, Université Paris-Sud. *Evaluation du lien génotype/phénotype G6PD*. Septembre à Décembre **2020**. Quatre mois. Co-encadrée par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Swaelie Sauthier. Année d'industrie, MSci Biomedical Science, York University, United Kingdom. *Malaria in French Guiana: transmission and treatment*. Septembre **2018** à Juin **2019**. Dix mois.

. M Maxime Agranier. 3ème année de Pharmacie, master 2 de microbiologie-infectiologie, pharma-science. Université Paris Descartes. *Validation des gènes de la plasmepsine II et de la plasmepsine III comme marqueurs moléculaires de résistance à la pipéraquine de* Plasmodium falciparum *en Guyane*. Juillet - Septembre **2018**. Trois mois. Co-encadré par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Adeline Mallard. Pédiatre, étudiante en master 2 de santé publique en e-learning. ISPED, Université de Bordeaux. *Connaissances, attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme dans les populations autochtones du*

bassin du bas Oyapock en Guyane. Mars - Juin **2017**. Quatre mois. Co-encadrée par Lise Musset et Emilie Mosnier.

. Mme Luana Mathieu. Université de Bordeaux, Master 2 Microbiologie et immunologie. *Mutations au niveau du gène* pfk13 *et résistance de* P. falciparum *aux dérivés de l'artémisinine dans le bassin amazonien*. Décembre **2015** - Mai **2016**. Six mois.

. Mme Nadia Sadok. Université de Rennes 1, Master 2. *Analyse du fitness des souches de* P. falciparum *porteuses d'un nouvel allèle du gène* pfcrt *lié à la réversion de la chloroquino-résistance*. Janvier-Mai **2015**. Six mois. Co-encadrée par Stéphane Pelleau et Lise Musset.

· Mme Vicencia Davito. Faculté de pharmacie de Limoges, Master 2 recherche Zoonoses et environnement. *Analyse de la diversité génétique autour du gène* pfcrt *de* Plasmodium falciparum *associé à la résistance à la chloroquine en Guyane.* Janvier-Mai **2013**. Six mois. Co-encadrée par Stéphane Pelleau et Lise Musset.

· Mme Mélanie Trouvay. Institut de santé publique, d'épidémiologie et de développement Bordeaux 2, Master 2 santé publique internationale option contrôle et surveillance des pathologies tropicales. *Etude de la sensibilité des tests de diagnostic rapide du paludisme en Guyane*. Avril-Août **2011**. Quatre mois.

· Mme Zoé Boulard. Université Paris 6, Master 1 Biologie cellulaire et moléculaire. *Comparaison phénotype in vitro à la chloroquine et génotype* pfcrt *de* P. falciparum *en Guyane*. Février-Avril **2011**. Deux mois.

· Mme Arielle Salmier. Faculté des sciences et techniques de Limoges, Master 2 Neuroépidémiologie et parasitologie tropicale. *Etude de la diversité génétique de* P. vivax *en Guyane*. Décembre-Mai **2010**. Six mois.

· M Martin Moune. CNR Paludisme Paris, Maîtrise. *Initiation à la recherche, aux critiques d'articles et à la rédaction d'un rapport de stage*. Janvier - Mars **2005**. Deux mois.

Ingénieur

. Mme Stessie Reine-Adelaïde. Ecole d'Ingénieur du CESI, St Nazaire, 3ème année. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquine chez* P. falciparum *en Guyane*. Juin **2016**. Cinq semaines. Co-encadrée par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

. Mme Célia Rahman. Ecole d'Ingénieur du CESI, Mont St Aignan, 3ème année. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquine chez* P. falciparum *en Guyane*. Septembre-Octobre **2015**. Deux mois. Co-encadrée par Yassamine Lazrek et Lise Musset.

· Mme Anaïs Leroy. Ecole d'Ingénieur de Biologie Industrielle 2ème année secteur qualité. *Mise en place du système documentaire qualité du laboratoire*. Juillet-Août **2009**. Deux mois.

· Mme Anne-Sophie Parant. 2ème année d'Ecole d'Ingénieur de Biologie Industrielle secteur recherche. *Mise au point du typage moléculaire de* P. falciparum. Juillet-Août **2008**. Deux mois.

Licence

. Mme Andréa Duclos. Université de Sheerbrooke (Canada), 2ème année de licence. *Génotypage de la G6PD et de ses variants*. Septembre - Décembre **2019**. Quatre mois.

. M Stéphane Alibar. Université de Guyane, Licence 2. *Analyse du génotype du gène P14 en lien avec la résistance à la pipéraquine chez* P. falciparum *en Guyane*. Mai **2016**. Cinq semaines. Encadré par Lise Musset et Yassamine Lazrek.

· Mme Leïla Bellony. Université de Picardie Jules Verne, Licence Biologie humaine 3ème année. *Stage d'observation*. Avril-Mai **2013**. Un mois.

· M. Frantz Paul. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biologie, géologie, santé parcours, biochimie et biotechnologie. *Etude de la diversité génétique des isolats de* P. falciparum *collectés durant l'épidémie de Saül de 2008*. Avril **2010**.

· Mme Leïla Withnel. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biochimie et Biotechnologie. *Optimisation du milieu de culture utilisé pour la multiplication* in vitro *de* P. falciparum*.* Avril **2009**. Un mois.

· Mme Lindsay Gamer. Université des Antilles et de la Guyane, Licence 3 Biologie et Sciences de la Santé. Février **2009**. Un mois.

BTS – Stagiaires européens ERASMUS

. M Piet Wubbenhorst. Université de Berlin, Technicien en stage ERASMUS. *Découvertes des techniques de diagnostic et de génotypage des plasmodies*. Février - Mai **2019**. Quatre mois. Co-encadré par Lise Musset et Béatrice Volney.

. Mme Maeva Nodin. Etudiante en 1ère année de BTS Analyses de Biologie Médicale. Lycée Jean Monnet, Franconville. Découverte des techniques de laboratoire. Mai - Juin **2017**. Sept semaines. Co-encadrée par Lise Musset et Béatrice Volney.

. M Marco Klein. Université de Nurnberg, Technicien en stage ERASMUS. *Découvertes des techniques de phénotypage et de génotypage des plasmodies*. Février-Mai **2016**. Quatre mois. Co-encadré par Lise Musset et Béatrice Volney.

. Mme Samira Dorante. DUT Génie biologique, IUT Lyon 1. *Paludisme en Guyane : Evaluation du portage de parasites chez les orpailleurs*. Juin **2015**. Quatre semaines. Co-encadrée par Béatrice Volney et Lise Musset.

Collégiens

. Mlle Euriel Lacoste. Stage découverte entreprise 3ème, Collège Gérard Holder, Cayenne. Découverte du monde du travail dans le domaine de la recherche et de la santé publique. Janvier **2019**. Une semaine.

. Mme Pauline Igue. Stage découverte entreprise 3ème, Collège Ste Thérèse, Rémire-Montjoly. Découverte du monde du travail dans le domaine de la recherche et de la santé publique. Novembre **2018**. Une semaine.

Diffusion de savoir auprès des professionnels de santé

· **Depuis 2008**. Dans un premier temps de manière à augmenter puis à maintenir le niveau d'activité du CNR paludisme, j'ai construit et animé un **réseau de partenaires** en Guyane et aux Antilles. La sensibilisation est constante. Au cours de ces missions, une présentation des missions du CNR, des actualités et des résultats dans la zone est effectuée. Dans ce cadre j'organise et élabore annuellement une **rétro-information** pour les partenaires sous forme de bulletin qui a pour objectif de présenter (i) le niveau de participation de chaque partenaire afin d'améliorer la représentativité des échantillons reçus, (ii) le niveau de résistance des plasmodies, (iii) les résultats des actions et projets menés par le Pôle Zones endémiques du CNR Paludisme.

· **2020**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 28 janvier, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme en Guyane, vers l'élimination ?, ii) PALUSTOP : bilan chiffré et outils d'éducation à la population, perspectives en milieu scolaire, iii) Echecs de l'Eurartesim® en Guyane : caractérisation et impact.

· **2018**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris. Trois présentations : i) Le paludisme sud-américain : contexte, situation épidémiologique et recherche opérationnelle, ii) Malakit : une étude pilote innovante face à la situation complexe de la transmission du paludisme sur les sites d'orpaillage, iii) REAGIR face a la résistance aux ACTs sur le plateau des Guyanes, acte 1 : résistance à l'artémisinine au Guyana.

· **2016**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris. Le plateau des Guyanes est-il la prochaine région d'émergence de la résistance aux artémisinines? ; ii) Efficacité thérapeutique de la chloroquine en Guyane 2009 - 2015

· **2014**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 18 décembre, Paris. Deux présentations : i) Evolution de la résistance de *P. falciparum* en zone de faible transmission : réversion de la résistance à la chloroquine par acquisition d'une nouvelle mutation ; ii) Laboratoire associé Antilles-Guyane : Données 2013 et activités 2014.

· **2013**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 17 décembre, Paris (France). Trois présentations : i) Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2012, tendances 2013 ; ii) Phénotypage vis-à-vis des dérivés de l'artémisinine : présentation du test RSA ; iii) Traitement par primaquine en Amérique du Sud : recommandations OMS et pratiques.

· **2012**. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris (France). Une présentation : Paludisme aux Antilles-Guyane : données 2011, tendances 2012.

Activités pédagogiques et d'enseignements, diffusion grand public

· Depuis 2019 **Formation d'enseignants** de Sciences de la Vie et de la Terre du secondaire au paludisme en Guyane, à la résistance. Elaboration de séquences pédagogiques. Coordination : Inspectrice régionale en SVT.

· Depuis 2007 Intervention de **sensibilisation en milieu scolaire écoles/collèges/lycées** au paludisme et aux messages de santé publique. Etablissements de Guyane essentiellement situés en zone d'endémie. Elaboration d'outils pédagogiques de diffusion du savoir et d'éducation à la santé.

Participation à la **fête de science** pour faire découvrir ce qu'est le paludisme et comment s'en protéger.

· 2016 **Séminaire Laveran Deane** à destination des doctorants brésiliens travaillant sur la thématique du paludisme. Une semaine de travail et d'échanges autour de leur sujet de thèse et présentation de mes travaux en tant que chercheuse, Mangaratiba, Brésil (coordination : C. Tadeu-Ribeiro).

· 2015 **Enseignement post-universitaire**, Cayenne et St Laurent du Maroni. Menaces d'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine dans la région.

Formations technique : RSA et multiplication parasitaire des partenaires surinamaises, Cayenne.

· 2010-2012 Cours sur les mécanismes de résistance des plasmodies dans le cadre du **DU de Pathologies Tropicales** de l'Université Antilles-Guyane (coordination : Pr B. Carme).

· 2005 **Travaux dirigés niveau maîtrise** à l'Université Paris Descartes (70 heures) – Paris.

Financements obtenus

· 2018 Pertinence des tests de diagnostic rapide sur le plateau des Guyanes, caractérisation de *pfk13* dans la même zone (WHO)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **39 300€** (46,227$). 12/2018 - 12/2020.

· 2018 La science au service de la population : en route vers l'élimination du paludisme en Guyane (Rotary)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **79 922€**. 09/2018 - 08/2019.

· 2017 ELIMALAR : Elimination du paludisme en Guyane, évaluation des approches et des outils les plus pertinents (FEDER, ARS)
Coordinatrice : L. Musset. Montant global du projet : **1 158 698€** Montant du financement accordé : **585 638€** par les fonds européens FEDER et **95 000€** par l'ARS Guyane. 06/2017 - 05/2020.

· 2017 CNR Paludisme (SPF)
Coordinatrice : S. Houzé. Coordination adjointe et responsable Pôle Zones endémique : L. Musset. Financement annuel IPG sur cinq ans : **215 000€**. 01/2017 – 12/2021.

· 2015 Malaria resistance, malaria resistance to the current recommended drugs in the Amazon region: a multicentric study to enlighten malaria control programs (Guyamazon III)
Coordinateurs : L. Musset, M Lacerda. Montant : **92 720€**. 09/2015 - 12/2018.

· 2014 Caractérisation de la résistance aux artémisinines au Guyana (WHO)
Point focal : L. Musset. Montant : **15 946€**. 12/2014 - 12/2018.

· 2014 Amélioration de la prise en charge du paludisme, évaluation des tests rapides, évaluation des tests TDR paludisme et G6PD (ARS)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **65 000€**. 04/2014 - 12/2019.

· 2014 PlasmoDynEvol, valeur adaptative d'un nouveau marqueur de sensibilité à la chloroquine en Amazonie (Labex CEBA)
Coordinateurs : L. Musset, S. Pelleau. Montant : **18 430€**. 04/2014 - 03/2015.

· 2013 ACIP Substances naturelles A10/2013, activité des substances naturelles amazoniennes sur le blocage de la transmission de *P. falciparum* (RIIP)
Coordinateur : E. Legrand. Partenaire : L. Musset. Part IPG : **24 300€**. 09/2013 - 08/2014.

· 2013 Oemarquine, origine et évolution des marqueurs de résistance à la chloroquine de *P. falciparum* en Guyane (Labex CEBA)
Coordinatrice : L. Musset. Montant : **11 600€**. 07/2013 - 12/2014.

· 2013 Amazomics, étude des facteurs génétiques associés à l'évolution adaptative en général avec un volet *Plasmodium* (Labex CEBA)
Coordinateur : B. de Thoisy. Coordinateurs volet *Plasmodium* : L Musset, S. Pelleau. Part IPG : **35 002€**. 05/2013 - 04/2015.

· 2012 ACIP Artémisinine A14/2012, étude *in vitro* de la résistance aux dérivés de l'artémisinine (RIIP)
Coordinateur : B. Witkowski. Responsable local : L Musset, E Legrand. Part IPG : **6 600€**. 09/2012 - 08/2014.

· 2012 CNR Paludisme (InVS)
Coordinateur : S. Houzé. Responsable Pôle Antilles-Guyane : L. Musset. Part IPG : **182 467€** annuels. 01/2012 - 12/2016.

· 2011 STRonGer (Fonds Européens FP7)
Coordinateur : P. Quénel. Co-leader WP2, « Rénovation des locaux et construction d'un insectarium de niveau 3 » : Lise Musset. Montant total : **3 726 156€,** part WP2 : 1 567 487€. 11/2011 - 10/2014.

· 2011 ACIP Gamétocytes A06/2011, établissement d'une collection de référence d'isolats de *Plasmodium falciparum* produisant des gamétocytes (RIIP)
Coordinateur : J. Popovici. Partenaire : L Musset. Part IPG : **6 000€**. 10/2011 - 09/2013.

· 2011 ACIP Culture, adaptation de *P. falciparum in vitro* (RIIP)
Coordinateur : D. Ménard. Responsable local : L Musset. Part IPG : **9 000€**. 08/2011 - 07/2012.

· 2011 PRAOYA, adaptation de *P. falciparum in vitro* (FCR)
Coordinatrice : L Musset. Part IPG : **23 960€**. 02/2011 - 01/2014.

· 2009 Evaluation de l'activité antipaludique nouveaux antipaludiques (MMV)
Coordinateur : B. Pradines. Partenaire : L. Musset. Part IPG : **10 000€**. 01/2009 - 12/2009.

Participation aux jurys de concours

· 2012 Assistant ingénieur interne, BAP J, Assistant en techniques biologiques
Adjoint technique principal 2ème classe externe et interne, BAP A, Préparateur en SVT et biotechnologies

Société savante et organisation professionnelle

· Depuis 2019 Conseillère ordinale, collège biologie, Section E, Guyane

· Depuis 2014 Membre de la Société Américaine de Médecine Tropicale et d'Hygiène.

Communications scientifiques (hors expertise)

Tableau de synthèse des communications scientifiques

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Orales																		
Internationales	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1	1	1	1			2 (2)	2	2 (2)	2 (1)	1	1 (1)	1 (1)	1	**21 (12)**
Orales nationales		1 (1)		1	1		3				2		1 (1)	1	6 (1)			**16 (3)**
Affichées																		
Internationales		1 (1)	1			1		1 (1)	2 (2)	2	2	2	1	2 (1)	3	4		**22 (5)**
Nationales	1 (1)	1 (1)				1	1		1				4		1			**10 (2)**
Total	3	5	2	2	2	3	5	1	3	4	6	4	8	4	11	5	1	69
Que j'ai présenté	**3**	**5**	**2**					**1**	**2**	**2**		**2**	**2**	**1**	**2**	**1**		**22**

Entre parenthèse figure le nombre de communications que j'ai moi-même présenté.

Communications orales internationales

· Mosnier E, Djossou F, Priam R, Demar M, Epelboin L, Douine M, Nacher M, Carbunar A, Gaillet M, Landlier J, Lazrek Y, **Musset L**. **2020**. Mass PCR testing and targeted treatement for malaria in a low transmission area in Amazonia, French Guiana. *30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,* 18-24th April, Paris (France).

· Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Restrep J, Guidez A, Epelboin Y, Sanna A, Michaud C, Djossou F, Ardillon V, Davy D, Douine M, **Musset L**, Roux E. **2019**. Resurgence risk for malaria: characterization of a recent outbreak of *Plasmodium vivax* in a border area French Guiana-Brazil, 2017. *7th International Conference of Plasmodium vivax research,* 26-28th June, Paris (France).

· **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houzé P, Abboud P, Volney B, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2018**. Emergence of *P. vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).

· Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. **2018**. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. Abst n°71. *67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).

· Cerqueira GC, Pelleau S, Melnikov A, Schaffner SF, Volney B, Cheeseman IH, Lazrek Y, Djossou F, McDew-White M, Nair S, Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJ, Legrand E, Nosten F, Birren B, **Musset L,** Neafsey DE. **2017**. Comparative longitudinal population genomic surveys of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in French Guiana and Thailand. *Abst n° 1365. 66rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 5-9th November, Baltimore (USA).

· **Musset L**. **2016**. Malaria resistance to the current recommended drugs in the Amazon region: a multicentric study to enlighten malaria control programs. *Guyamazon program*, 14th June, Belem (Brazil). Conférence invitée.

· Gabryzweski S, Lee MCS, Straimer J, Ng C, Gnadig N, Veiga MI, Dhingra S, Modchang C, Lee A, Vanaerschot M, Ross L, **Pelleau S**, Witkowski B, **Musset L**, Chookajorn T, Menard D, Fidock DA. **2016**. Leveraging Genome Editing to Define the Genetic Basis of Antimalarial Drug Resistance. *Keystone malaria symposia : Drug Discovery for Parasitic Diseases*, 24-28th January, Tahoe City (USA).

· **Musset L**. **2015**. Guiana Shield – The next frontier for artémisinine resistance Pf?. *Abst n°1241. 64rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 25-29th October, Philadelphia (USA). Conférence invitée.

· **Musset L**. **2015**. PfCRT and reemergence of chloroquine sensitive *P. falciparum*. *XIV Reunião National de Pesquisa em Malaria*, 30 septembre au 3 octobre, Sao Paulo (Brésil). Conférence invitée.

· **Pelleau S**, Moss EL, Dhingra S, **Volney B**, **Casteras J**, Volkman SK, Wirth DF, **Legrand E**, Fidock DA, Neafsey DE, **Musset L**. **2014**. Reversal of chloroquine resistance in *P. falciparum* in French Guiana: an original evolutionary pathway from low endemic settings and implications for resistance surveillance in South America. *Abst n°1241. 63rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 2-6th November, New-Orleans (USA).

· Pelleau S, Moss EL, Dhingra S, Volney B, Casteras J, Volkman SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA, Neafsey DE, **Musset L**. **2014**. Malaria parasites in low-endemic settings: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of novel mutations. *Scientific symposium of the Institut Pasteur International Network*, 8-14 September, Paris (France).

· **Musset L**. 2013. Malaria in French Guiana: Overview and public health activities. *XIII Reuniao Nacional de Pesquisa em Malaria*, 20-23 novembre, Manaus (Brazil). Conférence invitée.

· **Musset L**. 2013. Malaria in French Guiana: challenges and research questions to fight malaria. *Microbial Genomic Group meeting*, 07 novembre, Boston (USA). Conférence invitée.

· Prugnolle F, Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C , Durand P, Akiana J, Anderson JA, Aubouy A, Balloux F, Besnard P, Bogreau P, Carnevale P, D'Alessandro U, Fontenille D, Gamboa D, Jombart T, Le Mire J, Leroy E, Maestre Buitrago A, Mayxay M, Ménard D, **Musset L** , Newton PN, Nkoghé P, Noya O, Ollomo B, Rogier C, Smithuis F, Veron V, Wide A, Zakeri S, Carme B, Chevillon C, Legrand E, Renaud F. **2010**. *Plasmodium falciparum* and humans: Together on the road? *First Seminario "Paludismo"*, 9 octobre, Caracas (Vénézuela).

· Legrand E, **Musset L**. **2009**. *In vitro* monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French Guiana (1994 - 2008). *Réunion régionale des responsables nationaux des programmes de contrôle et de prévention du paludisme*, 10-12 novembre, Guayaquil (Equateur).

· Valderramos S, **Musset L**, Valderramos JC, Johnson D, Petersen I, Legrand E, Fidock DA. Mutant PfCRT does not confer high levels of chloroquine resistance to all strains of *Plasmodium falciparum*. *Abst n°940. 56th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 4-8 novembre **2007**, Philadelphie (USA) et *Abst n°36. MAM - Molecular Approaches to malaria*, 3-7 février **2008**, Lorne (Australie).

· **Musset L**, Le Bras J, Clain J. **2006**. Multiple independent origins of atovaquone-proguanil *falciparum* resistance. *Abs n°297. 55rd annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 12-16 novembre, Atlanta, (USA).

· **Musset L**, Moune M, Le Bras J, Clain J. **2005**. Diversité génétique du génome mitochondrial de *P. falciparum* et résistance à l'atovaquone-proguanil. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, 15-16 décembre*, Paris (France).

· **Musset L**, Bouchaud O, Massias L, Matheron S, Le Bras J. **2005**. Atovaquone/proguanil treatment failures in France in 2003-2004. *Abst n°O3. 1st International conference of the journal of travel medicine and infectious disease*, 10 novembre, Londres (Royaume-Uni).

· **Musset L**, Massias L, Matheron S, Bouchaud O, Le Bras J. **2004**. Atovaquone/proguanil treatment failures in France in 2003-2004. *Abst n°116/27S. 6ème European congress on chemotherapy and infection and 24ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse*, 1-3 décembre, Paris (France).

· **Musset L**, Parzy D, Pradines B, Durand R, Bigot P, Le Bras J. **2004**. Absence of cytochrome *b* polymorphism in atovaquone resistant African isolates of *Plasmodium falciparum*. *Abst n°564. 53rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 7-11 novembre, Miami (USA).

Communications orales nationales

· Mosnier E, Cropet C, Moriceau O, Lazrek Y, Michaud C, Gaillet M, Mathieu L, Demar M, Odonne G, Douine M, Pelleau S, Djossou F, Roux E, **Musset L**. **2018**. Répartition spatiale et facteurs de risque de portage de paludisme à la frontière entre la Guyane et le Brésil. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris (France).

· Berthelot L, Lazrek Y, Volney B, **Musset L**. **2018**. Prévalence des délétions des gènes *pfhrp*$_2$ et *pfhrp*$_3$ chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes. *2ème journée des travaux scientifiques des jeunes médecins de Guyane,* 7 Décembre, Cayenne (Guyane).

· Mosnier E, Bidaud B, Sanna A, Moriceau O, Dusfour I, Lazrek Y, Gaillet M, Travers P, Gauduchon S, Michaud C, de Laval F, Ardillon V, **Musset L**, Brousse P, Roux E. **2018**. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. *XXIVème Actualités du Pharo,* 3-5 Octobre, Marseille (France).

· **Musset L**. **2018**. Plasmodia on the Guiana Shield : a particular adaptation process driven by strong selective forces from the host. *Journées annuelles du labex CEBA,* 1er octobre, Cayenne (Guyane). Conférence invitée.

· Moriceau O, **Musset L**, Barbosa R, Lazrek Y, Michaud C, Abboud P, Walter G, Cebe M, Djossou F, Mosnier E. **2018**. Nouvelles stratégies de dépistage de terrain du paludisme : importance et rôle de l'infirmier coordinateur sur le projet PALUSTOP. *19ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 13-15 Juin, Rennes (France). Prix JNI meilleur présentation infirmier.

· Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. **2018**. Projet Malakit (paludisme et orpaillage) : un exemple d'adaptation à la prise en charge de populations vulnérables. *Rencontre de santé publique Antilles-Guyane*, 17-19 avril, Cayenne (Guyane).

· **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2017**. Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium vivax* en Guyane. *18ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 21-23 Juin, Saint Malo (France).

· **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2016**. Efficacité thérapeutique de la chloroquine dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium vivax* en Guyane. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 15 décembre, Paris (France).

· Pelleau S, Moss EL, Volney B, Casteras J, Legrand E, Neafsey DE, **Musset L**. **2014**. Identification of a new molecular marker for *Plasmodium falciparum* drug susceptibility in French Guiana: potential implications for malaria control in South America. *9th Conference Louis Pasteur: Emerging Infectious Diseases*, 09-11 avril, Paris (France).

· Hubert V, Dahlstrom S, Bertaux L, **Musset L**, Clain J, Le Bras J. **2014**. Résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil : typage des souches importées en France métropolitaine 2002-2011. *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, 09-11 mai, Rennes (France).

· Legrand E, Ariey F, Berger F, Menard D, Peneau J, Randrianarivelojosia M, Vial H, Fraisse L, **Musset L**. **2010**. Etude multicentrique de l'activité antipaludique des molécules SSR97193 et SAR97276. *2ème Journées interrégionales de la veille sanitaire*, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).

· Djossou F, Naldjinan R, **Musset L**, Volney B, Demar M, Mahamat A, Abboud P, Blanchet D, Aznar C, Carme B, Legrand E. **2010**. Surveillance *in vivo* des antipaludiques utilisés pour le traitement des accès palustres à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* à Cayenne. Bilan d'étape. *2ème Journées interrégionales de la veille sanitaire*, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).

· Berger F, Girod R, Rosine J, Grenier C, Djossou F, **Musset L**, Legrand E, Ruello M, Sanquer MA, Gaborit P, Besançon L, Flamand C. **2010**. Investigation d'une épidémie de paludisme, Saül (Guyane), janvier 2009. *2ème Journées interrégionales de la veille sanitaire*, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).

· Legrand E, Volney B, **Musset L**. **2008**. Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Guyane (1994-2008). *Journées InterRégionales de la Veille Sanitaire*, 12-13 décembre, Fort de France (Martinique).

· Clain J, **Musset L**, Le Bras J. **2007**. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Conférences Jacques Monod "Evolutionary genetics of host-parasite relationships"*. 22-26 septembre, Roscoff (France).

· **Musset L**, Moune M, Le Bras J, Clain J. **2005**. Diversité génétique du génome mitochondrial de *P. falciparum* et résistance à l'atovaquone-proguanil. *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, 15-16 décembre, Paris (France).

Communications affichées internationales

· Galindo M, Lambert Y, Suarez-Mutis MC, Mutricy L, Hiwat H, **Musset L**, Peterka C, Sanna A, Adenis A, Nacher M, Vreden S, Douine M. **2019**. Experience from the field: how to implement a complex intervention study to control malaria in remote areas of the Amazon forest, within a cross-border context? Abst n°412. *68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20th to 24th, National Harbor (USA).

· Mok S, Ross L, Dhingra S, Yeo T, Shears M, Tripathi AK, **Musset L**, Sinnis P, Fidock DA. **2019**. Examining the Epistatic Interaction Between Plasmepsin II and PfCRT in *P. falciparum* Piperaquine Resistance. Abst

n°1553. *68th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20th to 24th, National Harbor (USA).

· Salmier A, Bogreau H, Baniecki M, Ha Nguyen KY, Briolant S, Legrand E, Neafsey D, de Thoisy B, **Musset L**, Roux E. **2019**. Input from microsatellites and SNPs: a highly polymorphic and outbreak-driven Plasmodium vivax population in French Guiana. 7*th International Conference of Plasmodium vivax research,* 26-28th June, Paris (France).

· Gaillet M, **Musset L**, Cropet C, Mallard A, Moriceau O, Djossou F, Nacher M, Mosnier E. Identification of social groups by their level of knowledge about malaria to support education programs in an Amazonian, multicultural and transborder context. Abst n°00456. 29*th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, April 13-16th, Amsterdam (Netherlands).

· Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, de Laval F, Pelleau S, Douine M, Abboud P, Bidaud B, Djossou F, **Musset L**. **2018**. Heterogeneous distribution of Plasmodium vivax and falciparum carriage on the border area between Brazil and French Guiana. Abst n°1034. *67th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).

· Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. **2018**. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).

· Manca MF, Jollivet A, Kezza C, Carles G, Misslin-Tritsch C, Barrelet A, Clouzeau J, Miller J, Boukhari R, Boex P, **Musset L**, Carod JF. **2018**. Endemic Malaria in West French Guiana: A 7 Years Retrospective Study. Poster n°6786. *American Society for Microbiology General Meeting & ICAAC, ASM Microbe*, 7-11th June, Atlanta (USA).

· Rougeron V, Tiedje KE, Chen DS, Rask TS, Gamboa DV, Maestre A, **Musset L**, Legrand E, Noya O, Yalcindag E, Renaud F, Prugnolle F, Day KP. **2017**. Evolutionary structure of *Plasmodium falciparum* major variant surface antigen genes in South America: Implications for epidemic transmission and surveillance. *Abst n° LB-5230*. *66rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 5-9th November, Baltimore (USA).

· **Musset L***, Heugas C*, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald S, Legrand E, Demar M, Djossou F. **2017**.Highlighting of *P. vivax* resistance to chloroquine in French Guiana during a therapeutic efficacy evaluation. *6th International Conference of Plasmodium vivax research,* 11-14th June, Manaus (Brazil).

· Gabryzweski S, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. **2016**. Combinatorial genetic modeling of *pfcrt*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Abst n°1499*. *65th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 13-17th November, Atlanta (USA).

· Douine M, Adenis A, **Musset L**, Demar M, Djossou F, Brousse P, Cairo H, Vreden S, Nacher M. **2015**. Malaria and illegal gold mines in a high income country: first description of the disease burden. *Abst n°308. 64th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 25-29th October, Philadelphia (USA).

· Chenet SM, Okoth SA, Chandrabose J, Lucchi N, Talundzic E, Huber C, Macedo de Oliveira A, Krishnalall K, Ceron N, **Musset L**, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. **2015**. Characterization of the K-13 propeller domain in Guyana for suspected artemisinin resistance. *Abst n°LB-5163. 64th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 25-29th October, Philadelphia (USA).

· Cottrell G, **Musset L**, Hubert V, Le Bras J, Clain J. **2014**. Within-host emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Abs n°225. 10th Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference: Biology and pathology of the malaria parasite*, 12-15th May, Heidelberg (Germany).

· Leba LJ, Popovici J, Houël E, Odonne G, Arnaud JO, Stien D, **Musset L**, Legrand E, Duplais C. **2014**. En route to new therapeutic and transmission-blocking molecules from Amazonian natural substances to control *Plasmodium falciparum* malaria. *Abs n°145. 10th Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference: Biology and pathology of the malaria parasite*, 12-15th May, Heidelberg (Germany).

· Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B. **Musset L**, **2013**. High performance of PfHRP2-based RDTs in French Guiana explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *Late Breaker*. *62nd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 13-17th December, Washington (USA).

· WWARN *in vitro* Pilot Project Group, **2013**. Determining the global range of IC50 values for *Plasmodium falciparum* reference clones. *Abs n°B647*. *62nd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 13-17th December, Washington (USA).

· **Musset L**, Salmier A, Legrand E, de Thoisy B. **2012**. An undifferentiated and polymorphic *P. vivax* population circulating in French Guiana between 2006 and 2010. *18th International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, 23-27th September, Rio de Janeiro (Brazil).

· **Musset L**, Trouvay M, Palazon G, Volney B, Blanchet D, Legrand E, Berger F, Carme B. **2012**. Low prevalence of *pfhrp2* deletion in French Guiana: implications for malaria diagnosis. *Abs n° MAL038*, *18th International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, 23-27th September, Rio de Janeiro (Brazil).

· **Musset L**, Salmier A, Legrand E, de Thoisy B. **2011**. Epidemic and interepidemic periods structure *Plasmodium vivax* population circulating in French Guiana between 2006 and 2010. *Abs n°1543*. *60th Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 4-8th December, Philadelphia (USA).

· Valderramos SG, Valderramos JC, Lehane AM, **Musset L**, Purcell LA, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Kirk K, Fidock DA. **2009**. The genetic background of *Plasmodium falciparum* determines the extent to which mutant PfCRT confers resistance to chloroquine. *Abs n°890*. *58th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 18-22th November, Washington DC (USA).

· Clain J, **Musset L**, Moune M, Le Bras J. **2006**. Mitochondrial genome diversity of *Plasmodium falciparum* isolates supports multiple independent origins of atovaquone-proguanil resistance alleles. *Keystone malaria symposia : functionnal genomics to biology to medicine*, 28th February, Taos (USA).

· **Musset L**, Bouchaud O, Clain J, Matheron S, Massias L, Le Bras J. **2005**. Selection of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Abs n°838*. *54rd Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, 14th December, Washington DC (USA).

Communications affichées nationales

· Mosnier E, Bidaud S, **Musset L**, Moriceau O, Gaillet M, Gauduchon S, Travers P, Brousse P, Lazrek Y, Sanna E. **2018**. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. Poster MV-ZOO-MIG-05. *19ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 13-15 Juin, Rennes (France).

· Faway E, **Musset L**, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, Legrand E. **2016**. *Pvmdr1* polymorphism from *Plasmodium vivax* isolates in French Guiana. *Institut Pasteur International Network Symposium*, 29 novembre – 2 décembre, Paris (France).

· Mosnier E, Douine M, **Musset L**, Rhodes S, Gaudin O, Davy D, Epelboin L, Pieter P, Mutricy R, Djossou F. **2016**. Attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme dans une communauté amérindienne de Guyane. *Poster n° TROP 14*. *17ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lilles (France).

· Mosnier E, Djossou F, Pelleau S, Douine M, Guarmit B, Brousse P, Mutricy R, Simonnet C, Gauduchon S, **Musset L**. **2016**. Importance du portage asymptomatique de plasmodies dans un quartier à transmission autochtone du paludisme en Guyane : enjeux pour une stratégie d'élimination. Poster n° TROP 15. *17ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lilles (France).

· Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Mutricy L, Blanchet D, Djossou F, Hiwat H, Demar M, Nacher M. **2016**. Paludisme et orpaillage en Guyane: une situation hétérogène mais alarmante. *Poster n° PADS 02 06*. *17ème Journées Nationales d'Infectiologie*, 7 au 9 juin, Lilles (France). Poster discuté en 5 diapositives.

· **Musset L**, Trouvay M, Palazon G, Volney B, Blanchet D, Legrand E, Berger F, Carme B. **2012**. Faible Prévalence de la délétion du gène *pfhrp$_2$* en Guyane : implications pour le diagnostic du paludisme. *3ème Journées InterRégionales de Veille Sanitaire des Antilles-Guyane*, 26-27 octobre, Le Gosier (Guadeloupe).

· Legrand E, **Musset L**, Volney B, Meynard JB, Berger F, Mercereau-Puijalon O. **2010**. Etude de la variabilité génétique des gènes *pfcrt* et *pfmdr1* des isolats de *Plasmodium falciparum* de Guyane. *2ème Journées interrégionales de la veille sanitaire*, 8-9 octobre, Cayenne (Guyane).

· Berger F, Girod R, Rosine J, Grenier C, Djossou F, **Musset L**, Ruello M, Sanquer MA, Gaborit P, Besançon L, Flamand C. **2009**. Investigation d'une épidémie de paludisme, Saül (Guyane), janvier 2009. *XVème Actualités du Pharo*, 17-19 septembre, Marseille (France).

· **Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J et correspondants. **2005**. Echecs thérapeutiques de l'association atovaquone-proguanil en France en 2003-2005. *Congrès de la Société Française de Parasitologie*, 15-16 décembre, Paris (France).

· **Musset L**, Parzy D, Pradines B, Durand R, Le Bras J. **2004**. *Plasmodium falciparum* : étude du polymorphisme du gène du cytochrome *b* associé à la résistance *in vitro* à l'atovaquone. *42ème Réunion du groupement des protistologistes de langue française*, 12-14 mai, Montpellier (France).

Résumé de mon parcours

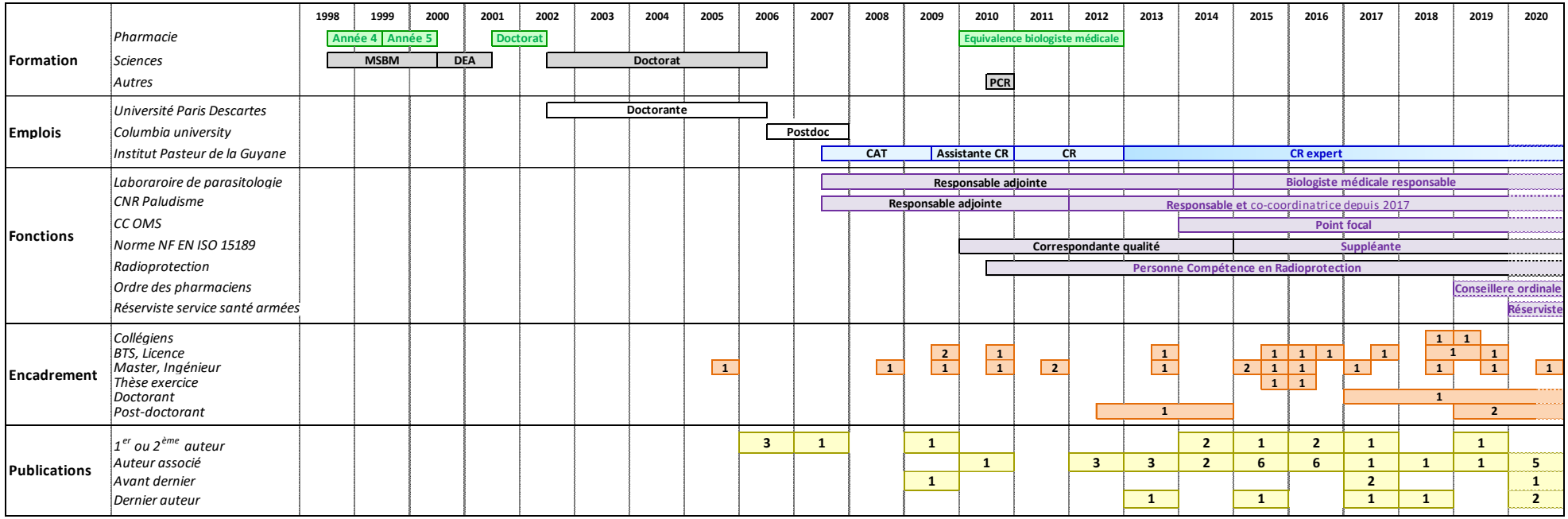
Lycéenne, j'étais déjà admirative du fonctionnement complexe et magique du corps humain. Comment l'évolution a-t-elle permis d'aboutir à un fonctionnement biologique aussi complexe, précis et robuste ? Après mon baccalauréat spécialité « Sciences de la Vie et de la Terre », je me suis donc orientée vers des études en santé et plus particulièrement, des études de pharmacie. Les premières années de pharmacie étaient très généralistes et abordaient de nombreuses disciplines telles que la chimie, la botanique, la zoologie, la physique ou encore les statistiques. C'est au cours de ces trois premières années d'études universitaires que j'ai découvert la parasitologie et toutes les pathologies qui en découlent et qui pour bon nombre d'entre elles, touchent les régions tropicales et inter-tropicales du globe. Cette localisation géographique faisait résonner en moi l'attachement que j'avais pour une région tropicale française, la Guyane. C'était donc décidé, la pharmacie d'officine ou hospitalière ne serait pas pour moi, je souhaitais devenir pharmacien-chercheuse et si possible sur une thématique qui me permette d'aller régulièrement en zone tropicale et inter-tropicale. J'ai donc commencé, en plus du cursus classique de pharmacie, à me spécialiser en parasitologie au cours d'une maîtrise des sciences biologiques et médicales. Après cela, et selon l'avis éclairé des parasitologues reimois, il me restait donc pour y arriver à obtenir : i) un DEA, ii) un financement de thèse, iii) une thèse, iv) un post-doctorat et enfin, bien plus complexe et incertain, v) un poste de chercheuse dans une institution de recherche, une université ou une industrie pharmaceutique… rien que cela (j'oublie d'ailleurs ici l'HDR dont on ne m'avait pas parlé à l'époque) ! Enfin, le cursus classique que tous les chercheurs connaissent bien mais qui, avec du recul, a bien de quoi en décourager plus d'un et impose du travail, de la constance et de la persévérance. A y regarder de plus près, il faut se lancer sans trop se poser de questions sinon ça pourrait faire peur !

Mes activités de recherche ont donc commencé en 2000, dans le cadre de mon DEA, au Centre National de Référence (CNR) chimiorésistance du paludisme à Paris à l'Hôpital Bichat-Claude Bernard sous la direction du Pr Jacques Le Bras (Figure 1). Le sujet de mon stage portait sur l'étude de la résistance de *P. falciparum*, agent du paludisme, à l'atovaquone-proguanil, une association d'antipaludiques tout juste mise sur le marché en France. Pour étudier cette association, j'ai ainsi eu à mettre au point un test *in vitro* permettant d'évaluer le niveau de sensibilité naturelle à l'atovaquone des parasites circulants en Afrique de l'Ouest et rapportés en France à l'occasion d'un voyage (📖 **P1** pour publication n°1, ou **Rx** pour les revues cf liste du curriculum vitae).

Avant de débuter mon doctorat de sciences et au vu des obstacles à franchir avant de réussir à être chercheuse, mon directeur de thèse et moi avions fixé l'objectif suivant : l'obtention de mon doctorat de **pharmacien d'officine**. On ne sait jamais ce que la vie nous réserve ! J'ai donc effectué six mois de stage fin 2001 dans une officine à Paris, dans le XVII^{ème} arrondissement. Ainsi, j'ai soutenu mon doctorat en pharmacie début 2002 à Reims sur la base des résultats obtenus au cours de mon DEA.

Début 2002, j'ai débuté mon doctorat en science autour des perspectives obtenues au cours de mon DEA. Elle s'est déroulée dans le même laboratoire/CNR, toujours sous la direction du Pr Le Bras, dans le cadre de l'Ecole Doctorale du Médicament, Université René Descartes Paris 5, avec un financement du Ministère de la Recherche que j'ai obtenu grâce à mon classement honorable en DEA. Mon travail s'est donc concentré sur la compréhension du mécanisme de résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone/proguanil. Plusieurs aspects ont été abordés au cours de cette formation : i) générer des parasites résistants sous pression médicamenteuse (il y avait effectivement très peu de résistance naturelle ou circulante à l'époque dans la population parasitaire), ii) valider un marqueur moléculaire de résistance *in vivo* chez l'homme (📖 **P2**) et iii), comprendre le mécanisme d'émergence et de sélection de ces mutations chez un patient en échec thérapeutique (📖 **P3**). Ce travail a donné lieu à plusieurs publications et a permis de montrer que les premiers parasites résistants identifiés ne circulaient pas en Afrique de l'Ouest mais émergeaient *de novo*, chez des patients au cours de leur infection. Je suis devenue **docteure ès sciences** en juin 2006.

En 2006, j'ai décidé d'effectuer un **postdoctorat** dans le laboratoire de David Fidock dans le département de microbiologie et de médecine de l'Université Columbia à New York afin d'élargir mes connaissances techniques et de découvrir un autre environnement de recherche tout en continuant à étudier la résistance aux antipaludiques.



BTS : Brevet de Technicien Supérieur ; CAT : Cadre Administratif et Technique ; CC OMS : Centre Collaborateur de l'OMS ; CNR : Centre National de Référence ; CQ : Chloroquine ; CR : Chargée de recherche ; DEA : Diplôme d'Etudes Approfondies ; MSBM : Maîtrise des sciences biologiques et médicales ; PCR : Personne Compétente en Radioprotection

Figure 1. Présentation synthétique de mon parcours.

Mon sujet de postdoctorat portait sur l'étude d'un transporteur vacuolaire impliqué dans la résistance aux lysosomotropes, PfCRT (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*). Ce travail a été financé par le ministère des affaires étrangères sous la forme d'une bourse Lavoisier et a permis de générer des lignées isogéniques transformées à différentes positions du gène *pfcrt* pour retracer la genèse des allèles de résistance (**P27**). Cette thématique autour du gène *pfcrt* se poursuit encore aujourd'hui sur les isolats de Guyane.

Fin 2007, j'ai quitté New-York pour rejoindre le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane en tant que **cadre administratif et technique** en CDD, responsable adjointe du laboratoire. Les dix-huit premiers mois ont été en grande partie consacrés à relancer les activités de santé publique du CNR Chimiorésistance du Paludisme (CNRCP) hébergé par le laboratoire : i) mise en place et sensibilisation d'un réseau de partenaires, ii) refonte du rapport d'activité, iii) réajustement des protocoles de phénotypages utilisés et harmonisation avec les laboratoires métropolitains, et iv) sensibilisation régulière du grand public lors de journées dédiées ou par la conception de fiches d'information.

En 2009, j'ai passé le concours de chercheur statutaire en biologie et santé publique de l'Institut Pasteur. J'ai intégré en septembre de la même année les cadres scientifiques de l'Institut Pasteur qualification "Assistante, chargé de recherche" détachée à l'Institut Pasteur de la Guyane. Entre 2010 et 2012, j'ai été promue "chargée de recherche" et en 2013, "**chargée de recherche expert**".

En 2012, j'ai eu à négocier le renouvellement de notre mandat de CNR auprès de l'InVS regroupant l'ensemble de la thématique « paludisme » (cf p.80). Aussi, une nouvelle organisation à quatre a dû être trouvée, trois laboratoires sur le territoire métropolitain et un en Guyane. C'est à cette occasion que je suis devenue **responsable du CNR Paludisme**, laboratoire associé pour la région Antilles-Guyane.

Tout au long de cette période, j'ai également mené un travail de fond au niveau international en participant autant que possible aux congrès et réunions internationaux de façon à augmenter la visibilité de notre laboratoire et de ses activités. J'ai à cette occasion pu construire un réseau professionnel conséquent et précieux qui me permet aujourd'hui d'approfondir les questions de recherche et d'augmenter l'impact des résultats obtenus (cf p.81). Cet investissement a abouti en 2014 à la désignation de notre laboratoire comme **Centre Collaborateur de** l'**Organisation Mondiale de la Santé** (CC OMS) pour la surveillance de la résistance aux antipaludiques dont je suis **responsable** depuis l'origine (cf p.80).

Depuis mon arrivée en Guyane, je me suis attachée à développer des thématiques de recherche s'appuyant sur mes expériences antérieures mais surtout en lien avec le territoire où j'exerce, à savoir : i) la problématique du paludisme en Amazonie, ii) son épidémiologie sur le plateau des Guyanes et iii) les activités de CNR et CC OMS que le laboratoire poursuit respectivement depuis 32 et 6 ans. Trois axes structurent ainsi la recherche : i) comprendre les mécanismes de résistance des plasmodies aux antipaludiques d'intérêt et leur évolution (cf p.35), ii) élargir les connaissances sur *P. vivax*, espèce prédominante dans la zone (cf p.56) et, iii) conduire des projets de recherche opérationnelle indispensables à l'optimisation de la prise en charge et du contrôle du paludisme dans la région (cf p.61).

La **recherche en santé publique** que je conduis se veut pluridisciplinaire, transversale et translationnelle, du malade au laboratoire en passant par les lieux de prise en charge et les zones de transmission. Forte de mon expertise, je tente en permanence de faire le lien entre les autorités sanitaires locales, nationales ou internationales et le monde de la recherche. Vulgariser les résultats, mesurer ce qu'ils impliquent et obtenir l'adhésion des décideurs pour qu'ils ajustent les programmes de lutte contre la maladie. Faire le lien aussi entre le temps long de la recherche, des démarches administratives associées et des décisions/concertations publiques, et la nécessité permanente d'améliorer rapidement la prise en charge des patients.

Ces travaux m'ont permis d'être aujourd'hui à l'origine ou associée à **51 publications** dont six revues. Les trois publications dont je suis la plus fière sont annexées à ce document. Mes perspectives en termes de recherche (Tableau 3, cf p.77) sont nombreuses et s'inscrivent dans ces mêmes axes en visant toujours à travailler dans l'intérêt des malades et des habitants de nos zones à risque. Une des perspectives sera aussi à court terme de renforcer les activités d'éducation sanitaire en milieu scolaire.

L'ensemble de ces activités de recherche est accompagné d'activités de formation et d'encadrement d'étudiants et de jeunes chercheurs du niveau BTS au niveau post-doctorant. Depuis le début de mon engagement dans la transmission de savoir, j'ai eu l'opportunité et la chance d'**encadrer 33 jeunes** (cf p.20 et **Erreur ! Signet non défini.**). La moitié avait un niveau master ou plus et incluait deux thèses d'exercice et une thèse de sciences en co-encadrement. Cette contribution à la formation des plus jeunes est pour moi une composante fondamentale de l'activité d'une chercheuse. Un scientifique doit pouvoir transmettre son savoir

et son savoir-faire et initier les plus jeunes à une culture scientifique et une approche méthodologique rigoureuse, basée sur un esprit critique et rationnel qui s'enrichit de l'expérience de la communauté, au sens large, qui nous entoure.

Par ailleurs, en tant que chercheuse dans le domaine du paludisme localisé en zone d'endémie et en tant que laboratoire de référence ayant de fortes implications en santé publique, il m'est difficile de concevoir mon métier sans y associer régulièrement des activités d'animation et de vulgarisation scientifique à destination du grand public et de plus en plus en milieu scolaire (cf p.22).

Par ailleurs, je suis depuis 2015 **responsable du laboratoire** et coordonne les activités de 5 à 9 personnes (cf p.86). Je prête une attention toute particulière à la définition d'orientations et objectifs pour le laboratoire qui sont annuellement présentés de manière à ce que chaque membre de l'équipe se les approprie et y trouve motivation et intérêt. Des temps d'échanges réguliers sont également ménagés individuellement de manière à maintenir une ambiance de travail satisfaisante basée sur des discussions libres autour des difficultés rencontrées ou des satisfactions obtenues.

Entre 2010 et 2014, j'ai été **correspondant qualité** du laboratoire ayant en charge le déploiement de la démarche qualité au sein du laboratoire. Ceci a abouti en août 2017 à l'accréditation de la PCR de diagnostic en temps réel d'espèces utilisée au sein du CNR selon la norme NF EN ISO 15189. La politique qualité du laboratoire que j'ai mise en place vise à ce que l'ensemble du fonctionnement du laboratoire bénéficie de cette démarche y compris les activités de recherche (cf p.84). Ainsi, cette évolution de statut des CNRs me permet d'exercer des fonctions de **biologiste médicale**. En 2018, j'ai été élue **conseillère ordinale** de la section E et je suis depuis 2020 réserviste du service de santé des armées. Enfin, depuis 2010, je suis la **conseillère en radioprotection** de l'Institut Pasteur de la Guyane gérant les aspects liés à la manipulation, détection de radioéléments (cf p.85).

Dans la suite de cet exposé, je présenterai dans le détail les différents travaux et résultats que j'ai pu obtenir au cours de mon parcours et l'implication dont j'ai fait preuve en matière d'encadrement. Au travers de ce document, j'espère pouvoir vous donner un aperçu complet de mon identité en tant que chercheuse, identité façonnée à partir de mes valeurs personnelles, ce qui m'anime, des rencontres et des opportunités que j'ai pu rencontrer ou initier.

Activités de recherche

Résultats et perspectives

1) Compréhension et dynamique des résistances aux antipaludiques
2) Etude de *Plasmodium vivax* en Guyane
3) Une recherche opérationnelle au service du contrôle du paludisme

Ce mémoire est assez dense, de manière à rendre sa lecture plus didactique, des symboles ont été ajoutés de manière à faciliter l'analyse des informations qu'il contient :

Activités d'encadrement d'étudiants et jeunes scientifiques que j'ai conduites

Px *Mes publications scientifiques (hors communications), numérotées par ordre chronologique*

Contexte et/ou mise en perspective du projet et/ou des résultats associés en termes de santé publique

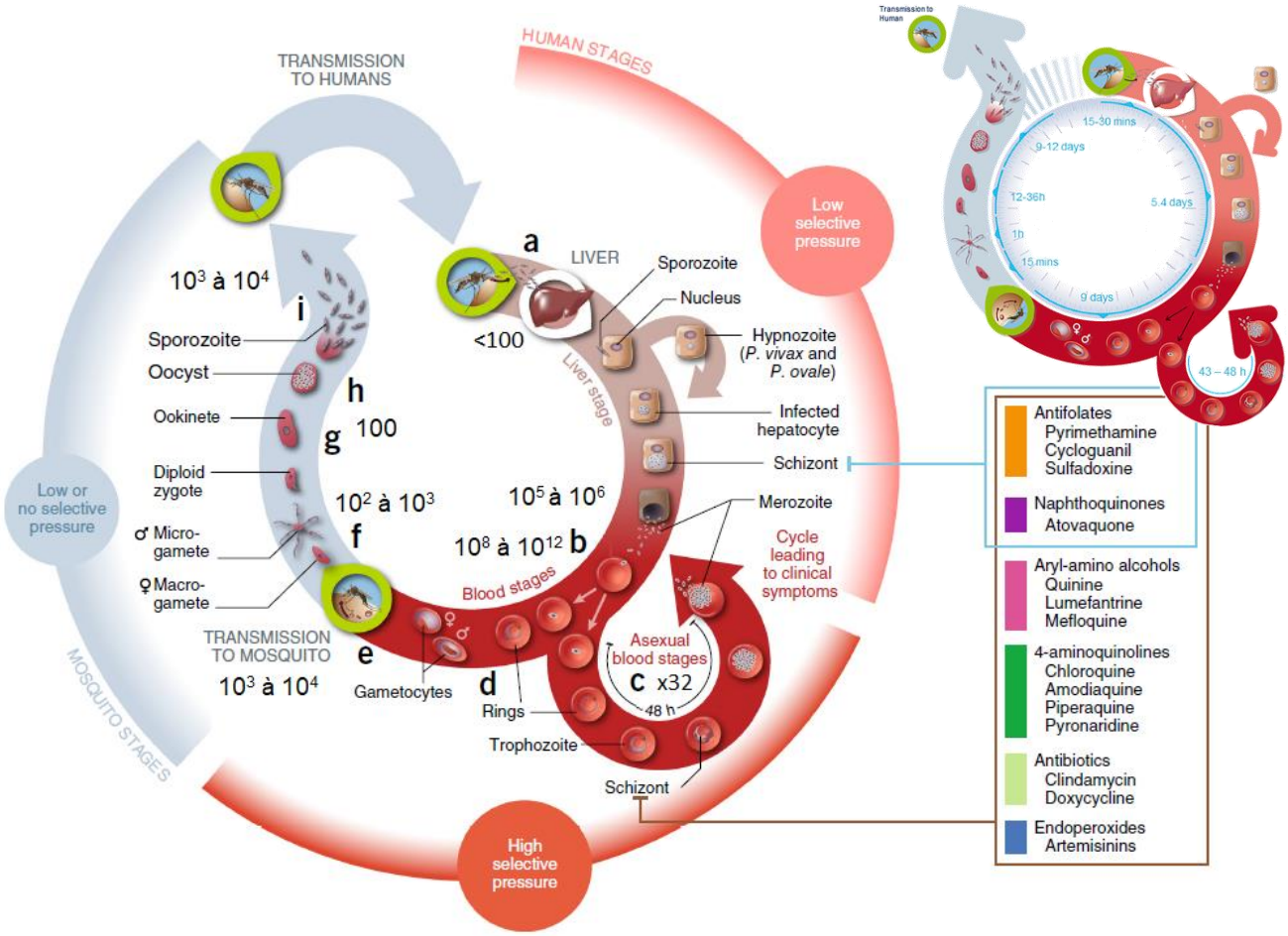
Perspectives associées au projet, à la thématique

COMPREHENSION ET DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTIPALUDIQUES

Les plasmodies sont des parasites unicellulaires eucaryotes responsables du paludisme. Leur cycle de développement est rapide et exponentiel. Elles se multiplient théoriquement d'un facteur 32 en 48h, durée d'un cycle érythrocytaire au sein d'un globule rouge infecté pour *Plasmodium falciparum*, *vivax* et *ovale*. Ainsi, un patient infecté compte dans son sang entre 10^8 et 10^{12} parasites circulants auxquels s'ajoutent les parasites qui peuvent être séquestrés dans les microvaisseaux, la rate ou la moelle osseuse (Figure 2) (Anderson and Roper 2005). Leur cycle de développement inclut des changements d'hôtes et de stades réguliers, des phases de multiplication asexuées chez l'Homme, l'hôte intermédiaire, et une phase de multiplication sexuée chez le moustique du genre *Anopheles*, l'hôte définitif. Ces changements successifs ne sont possibles sur le plan biologique que grâce aux nombreux mécanismes de régulation cellulaire et de recombinaison intervenant à différents moments du cycle. Cette plasticité permet une adaptation rapide des plasmodies au milieu dans lesquelles elles évoluent. Les pressions environnementales exercées sur elles incluent notamment les moyens de lutter contre cette pathologie, essentiellement les antipaludiques.

Schématiquement, les antipaludiques peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action en deux grandes catégories: les lysosomotropes (chloroquine, quinine, méfloquine….) qui s'accumulent dans un organite acide du parasite, la vacuole digestive, et les antimétabolites (pyriméthamine, atovaquone…..) qui sont des inhibiteurs compétitifs d'enzymes du métabolisme (Figure 2). A ces deux grandes catégories viennent aujourd'hui s'ajouter les dérivés de l'artémisinine. Ces principes actifs ont pour métabolite actif la dihydro-artémisinine. Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé tout comme leur localisation. Cependant, leur pont endoperoxide est activé par la molécule d'hème Fe^{2+} et ce majoritairement au stade rings (Xie, Dogovski et al. 2016). Une fois activée, l'artémisinine va se fixer sur les protéines pour les alkyler ou les ubiquitiner entraînant leur déstabilisation et leur dégradation au sein du protéasome (Talman, Clain et al. 2019).

La résistance aux antipaludiques est définie par l'OMS comme la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique donné à dose égale ou supérieure à celle généralement recommandée (WHO 2018). C'est un phénomène dynamique et évolutif, irrémédiable, qui apparaît pour toutes les molécules. Cependant, cette sélection est plus ou moins rapide et sous l'influence de nombreux facteurs incluant le nombre de parasites exposés aux différents stades (Figure 2), la spécificité d'action du médicament, sa demi-vie, le niveau d'immunité de l'hôte, la multiplicité de l'infection et les facteurs locaux qui affectent l'utilisation d'un principe actif. Un autre facteur majeur influençant la rapidité de sélection des parasites résistants est le mécanisme de résistance impliqué. La résistance apparaît généralement rapidement pour les molécules dont l'acquisition d'un petit nombre de mutations ponctuelles au niveau d'un gène codant la protéine cible (ex : les antimétaboliques) suffit à rendre les parasites résistants. Celle-ci est sélectionnée beaucoup plus lentement pour les principes actifs qui possèdent un mécanisme de résistance complexe faisant intervenir plusieurs transporteurs, très souvent vacuolaires, qui induisent une perte d'accumulation des molécules dans le parasite (ex : les lysosomotropes). Compte tenu du cycle de développement des plasmodies, on peut observer que la pression médicamenteuse est très élevée au moment du cycle érythrocytaire lorsque les parasites sont les plus nombreux et la probabilité de présence d'un individu modifié et adapté à résister à ce principe actif est la plus grande. Cette pression est également augmentée lorsque la demi-vie de la molécule est longue ce qui augmente le temps de contact parasite/molécule. *A contrario*, cette probabilité est plus faible lorsque le demi-vie des molécules est courte (ex : artémisinine ≈ 2h) ou lorsque les parasites sont dans leurs stades de développement hépatiques car ils sont moins nombreux, se répliquent peu, ou pas pour les hypnozoïtes de *P. vivax* (White 2004, Blasco, Leroy et al. 2017) (Figure 2).



Adapté de Blasco, 2017

Figure 2. Cycle de développement de *Plasmodium falciparum,* charge parasitaire et antipaludiques.
(a) C'est lors d'un repas sanguin nécessaire à la maturation de ses œufs qu'un moustique femelle, du genre *Anopheles*, infecté par *P. falciparum* inocule des sporozoïtes dans le derme de l'hôte intermédiaire, l'Homme (Blasco, Leroy et al. 2017). Moins de 100 sporozoïtes sont ainsi injectés (Alavi, Arai et al. 2003). Après une rapide migration tissulaire et sanguine, ces sporozoïtes pénètrent activement dans les hépatocytes grâce aux différents organites du complexe apical spécifique de l'embranchement des *Apicomplexa* (conoïde, granules denses, rhoptries et micronèmes). Une phase de réplication active produit au bout de cinq jours et demi environ 10 000 à 30 000 descendants de mérozoïtes par parasite intracellulaire. (b) Les mérozoïtes libérés (~ 10^5 à 10^6 au total) envahissent ensuite les globules rouges matures humains. Transformé en trophozoïte, ils se développent à l'intérieur d'une vacuole parasitophore et initient des cycles de multiplication d'environ 48 h au cours duquel ils forment des schizontes puis, après plusieurs divisions, un corps en rosace composé de 32 mérozoïtes. (c) Une fois libérés de manière active, les nouveaux mérozoïtes vont alors coloniser d'autres globules rouges sains. C'est la phase érythrocytaire de reproduction asexuée ou schizogonie où la charge parasitaire peut atteindre 10^8 à 10^{12}. A ce moment du développement, les parasites sont alors responsables des manifestations cliniques de la maladie. d) Les trophozoïtes peuvent également, si les conditions de développement se dégradent (présence de principes actifs dans le sang, pression immunitaire forte, anémie, infection mixtes…), se transformer en gamétocytes mâles ou femelles. Les gamétocytes jeunes sont alors sequestrés dans la moelle osseuse avant d'en ressortir au stade V, le stade mature permettant après trois jours dans la circulation sanguine la fécondation chez le moustique (Henry, Serme et al. 2019). Environ 1 à 2% des parasites intra-érythrocytaires entrent dans cette voie de développement sexué qui en 10 à 12 jours environ produit des gamétocytes mâles et femelles matures transmissibles aux moustiques. e) Environ 10^3 à 10^4 gamétocytes matures sont absorbés au cours d'un repas de sang. (f – i) La reproduction sexuée ou sporogonie se déroule chez l'hôte définitif, l'Anophèle, qui est aussi le vecteur de cette pathologie. Chez le moustique, les gamétocytes se transforment des gamètes mâles et femelles (~ 10^2 à 10^3) qui peuvent se féconder (f), formant environ 100 ookinetes (g), puis des oocystes (h). A la fin de leur développement, les oocystes libèrent 10^3 à 10^4 sporozoïtes dans la cavité générale de l'insecte qui iront rejoindre les glandes salivaires dans l'attente de leur inoculation à un nouvel hôte lors d'un deuxième repas sanguin (i).
Pour les espèces plasmodiales, *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites peuvent rester dans le foie sous forme d'hypnozoïtes et générer des accès palustres plusieurs mois voir plusieurs années après l'accès initial.
Les antipaludiques actuellement utilisable chez l'Homme sont listés dans les encadrés figurant au côté du cycle. En plus de leur action sur les stades asexués, la pyrimethamine, sulfadoxine, proguanil et l'atovaquone ont une action sur les stades hépatiques du parasites. Les artémisinines agissent elles aussi sur les stades précoces des gamétocytes. Seule la primaquine a une action sur les stades sexués matures et permet ainsi de limiter instantanément la transmission du paludisme ou encore tuer les hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax*.

Méthodes d'étude et paramètres associés

Pour caractériser la résistance parasitaire, trois grandes catégories de méthodes existent : les études *in vivo* qui permettent d'évaluer l'**efficacité thérapeutique des antipaludiques** chez le patient, les méthodes *in vitro* qui permettent d'évaluer la sensibilité des parasites au laboratoire et les méthodes de biologie moléculaire qui permettent de détecter les changements liés à la résistance au sein du génome. Ces trois grands types de méthode s'éclairent l'une l'autre. Ainsi, une bonne méthode *in vitro* doit avoir été mise au point et être interprétée en fonction des résultats observés *in vivo* avec les mêmes parasites. Ce modèle biologique permet de s'affranchir des variations inter-individuelles liées à la prise de médicament, leur absorption ou encore de l'effet du système immunitaire du patient qui peut être en capacité d'éliminer naturellement des parasites résistants aussi bien que les sensibles. Il existe aujourd'hui deux principales méthodes de phénotypage, le **test isotopique** qui mesure la capacité d'un antipaludique à inhiber la croissance parasitaire, CI_{50} pour concentration inhibitrice 50% (Le Bras and Deloron 1983) et le **test de survie** qui, après une courte exposition à la molécule, mesure la capacité des parasites à survivre et à se multiplier, soit un taux de survie exprimé en pourcentage (Witkowski, Amaratunga et al. 2013). Le deuxième type de test a été mis au point pour étudier essentiellement les artémisinines et ses dérivés. Ainsi, c'est souvent grâce aux méthodes *in vitro* que les **marqueurs moléculaires** de la résistance sont identifiés. Ces marqueurs présentent l'immense avantage d'être facile à étudier à partir d'échantillon de sang séché sur papier buvard et ce, même si les parasites sont morts. Les méthodes *in vitro* sont donc très importantes et nécessitent bien évidemment des parasites vivants ayant la capacité de se multiplier en condition de laboratoire. La **multiplication *in vitro* de *P. falciparum*** a été mise au point à la fin des années 1970, celle de *P. vivax* ne l'est pas encore (Trager and Jensen 1976).

Pendant plusieurs décennies, les études ont été conduites sur quelques souches de référence adaptées dans les années 1980. Aujourd'hui, quelques laboratoires situés en zone d'endémie adaptent des parasites de terrain à la multiplication *in vitro*. Ils ne sont cependant pas si nombreux car cela nécessite des infrastructures, une maîtrise totale de la technique et du personnel formé, tout cela en zone de transmission. Depuis 2009, j'ai beaucoup misé sur cet aspect. Après environ une année de mise au point de la méthode, notre laboratoire maîtrise aujourd'hui totalement cette technique. Nous adaptons donc systématiquement dans le cadre de nos activités de CNR les isolats de *P. falciparum* que nous recevons, pour certains jusqu'à 7/8 jours après leur prélèvement. Cette adaptation est immédiate, ce qui nous laisse penser que les parasites souffrent peu de cette adaptation et donc accumulent probablement peu de modifications génétiques associées à cette mise en culture (Nair, Li et al. 2018). Cette limitation des changements génétiques est fondamentale pour toutes les questions de recherche que l'on se pose autour des mécanismes et de l'acquisition de la résistance.

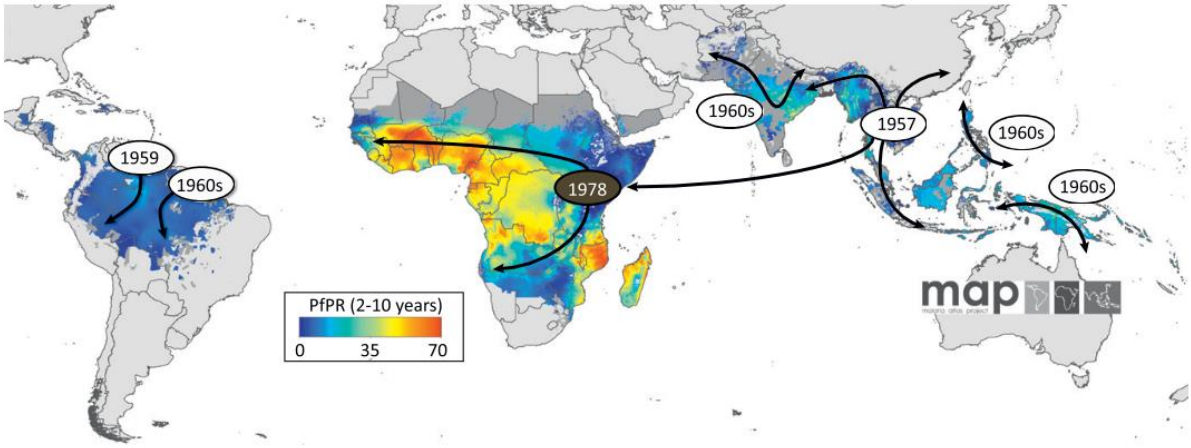
Enfin, l'autre technique de pointe que nous mettons en œuvre dans le cadre de cet axe de recherche vise à générer des lignées isogéniques de plasmodies. En effet, pour valider un marqueur moléculaire, nous l'introduisons au sein de parasites récemment adaptés, sensibles, provenant de notre zone de transmission, par **recombinaison homologue**. Ainsi, les souches ne diffèrent que par le marqueur étudié et nous pouvons ainsi valider ou invalider le lien causal entre cette modification génétique et le phénotype observé.

Depuis peu, nous utilisons de plus en plus les données de **séquençage haut débit** pour identifier les marqueurs de résistance sur la base de parasites phénotypés. Cette technique se démocratise de plus en plus et est de moins en moins coûteuse. Elle nécessite cependant des compétences en bioinformatique et des capacités de calculs qui sont difficiles à mettre en place au sein de l'Institut Pasteur de la Guyane. Nous travaillons donc en collaboration sur ces aspects.

Histoire courte de l'utilisation des antipaludiques et résistances associées

Le premier composé à avoir été utilisé en thérapeutique est la quinine, depuis le XVII^{ème} siècle. Durant la Deuxième Guerre mondiale, le besoin croissant en quinine et les carences régulières ont conduit les scientifiques de l'époque à élaborer et tester des centaines de molécules de synthèse dérivées de la quinine et appartenant à la famille des amino-4-quinoléines. C'est ainsi qu'ils ont identifié la chloroquine qui a ensuite été massivement utilisée et pendant plus de vingt ans, sans résistance. Cependant, au début des années 60, des résistances sont décrites en Colombie et au Vénézuela puis à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande (Payne 1987). À la fin des années 1990, l'avènement des différentes techniques de biologie moléculaire a permis l'identification, *a posteriori*, du marqueur moléculaire lié à la résistance à la chloroquine, la mutation K76T dans le gène *pfcrt* (Fidock, Nomura et al. 2000). Ce marqueur et l'étude de la diversité génétique autour de ce gène ont permis d'identifier six points d'émergence, indépendants mais simultanés de

la résistance, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud. C'est à partir de ces quelques foyers que les parasites résistants, sous l'influence de la pression médicamenteuse, ont disséminé à l'ensemble des zones de transmission pour atteindre l'Afrique au cours des années 80 (Ecker, Lehane et al. 2012, Awasthi and Das 2013) (Figure 3). Les mécanismes évolutifs ayant permis d'aboutir à ces parasites résistants, viables et se transmettant efficacement, ont probablement été nombreux. Cependant, les outils de biologie moléculaire étant apparus après l'émergence de la résistance, les connaissances actuelles de la résistance à la chloroquine sont basées sur l'étude d'individus résistants issus de plusieurs décennies d'évolution sous pression médicamenteuse (Anderson and Roper 2005).



Ecker, 2012

Figure 3. Emergence et dispersion de la résistance à la chloroquine chez *Plasmodium falciparum*. Carte présentant le taux d'infection à *P. falciparum* chez les 2-10 ans utilisant un modèle géostatistique. Six origines indépendantes de la résistance à la chloroquine ont été identifiées *a posteriori*. Il semblerait que les parasites asiatiques résistants se soient propagés aux zones d'endémie africaines à la fin des années 70 (cercle noir) par le biais des mouvements de populations humaines et des pressions médicamenteuses.

La perte d'efficacité de la chloroquine a conduit à l'utilisation de la sulfadoxine/pyriméthamine dans les années 70. Cependant, la résistance à cette association thérapeutique a très vite été sélectionnée puis s'est répandue en suivant le même chemin que la résistance à la chloroquine. Apparue d'abord en Asie du Sud-Est à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande puis en Amérique du Sud, la résistance s'est ensuite dispersée en Afrique (Cortese, Caraballo et al. 2002). Face à ce phénomène, d'autres antipaludiques ont été déployés – méfloquine, halofantrine, amodiaquine –, mais irrémédiablement, les mécanismes de l'évolution ont conduit à un échappement des plasmodies aux pressions qu'elles subissaient, dans le cas présent, les antipaludiques.

Ainsi, dans les années 2000, sur le même principe que ce qui se faisait pour la tuberculose et le VIH, les recommandations ont été de déployer des associations d'antipaludiques, deux dans un premier temps, pour retarder l'apparition des résistances. Jusqu'à ce jour, les bithérapies sont utilisées. Elles associent systématiquement un dérivé de l'artémisinine qui tue très rapidement les parasites et diminue le nombre de parasites exposés au deuxième principe actif, une molécule dite partenaire. La pharmacodynamique des principes actifs a largement guidé l'élaboration de ces associations : une artémisinine à demi-vie courte puis une molécule partenaire à demi-vie plus longue (ex : luméfantrine) voire, très longue pour la pipéraquine (22 jours). Ces associations à base de dérivés de l'artémisinine (ACT) sont recommandées en première ligne dans le monde entier excepté Haïti où la chloroquine est encore efficace. Les résistances observées en Asie du Sud-Est aux ACTs poussent à changer de stratégie pour associer maintenant trois molécules (Dipanjan, Shivaprakash et al. 2017). Les essais cliniques pour valider de telles associations sont en cours. La quinine associée à une tétracycline reste une deuxième ligne du traitement des cas graves. Peu de résistance à la quinine sont aujourd'hui rapportée alors que cette molécule est utilisée depuis plus de quatre siècle (Okombo, Ohuma et al. 2011).

Dans la suite de ce mémoire, j'ai choisi de vous détailler trois axes sur lesquels j'ai travaillé ou travaille encore autour de la compréhension des mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques. Il s'agit de : i) la résistance à l'atovaquone-proguanil, ii) l'implication du gène *pfcrt* dans la résistance aux amino-4-quinoléines et enfin, iii) la résistance aux artémisinines sur le plateau des Guyanes.

Résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone/proguanil : déterminants et évolution

Porteurs de projet : *J. Le Bras, J Clain*
Collaborations : *G. Cottrell, IRD, Paris, France*
B. Pradines, IMTSSA, Marseille, France
Financement : *Institut National de Veille Sanitaire*

♦ L'atovaquone/proguanil a été mise sur le marché en France au début des années 2000 pour le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum*. Très bien tolérée, elle est rapidement devenue le traitement de choix dans de nombreux hôpitaux français. Dès le début de ce travail en 1999, il nous est donc apparu nécessaire d'approfondir nos connaissances sur le(s) mécanisme(s) de résistance du parasite à cette association afin de pouvoir prévenir et déceler toute perte éventuelle d'efficacité dans les meilleurs délais, à l'aide d'outils adaptés et facile d'utilisation.

Évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à l'atovaquone et détermination du seuil de résistance

Afin de pouvoir détecter les isolats résistants, mes premiers objectifs de thèse ont été de : i) mettre au point un test de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone, ii) définir un seuil de résistance corrélé avec l'efficacité thérapeutique observée chez les patients sous traitement et, iii) évaluer le niveau de sensibilité naturelle des parasites circulants en Afrique et importés en France par des voyageurs. J'ai ainsi montré sur la base d'un échantillonnage de 477 isolats collectés chez des voyageurs au retour d'Afrique de l'Ouest, que la population parasitaire circulant dans cette région, non exposée à la pression médicamenteuse par atovaquone-proguanil, était naturellement sensible *in vitro* à l'atovaquone. La confrontation de ces résultats aux données d'efficacité thérapeutique obtenues *in vivo* chez les patients traités par cette même association et suivis à l'hôpital Bichat m'a également permis de définir un premier seuil de résistance *in vitro* à l'atovaquone à 1600nM. Depuis cette étude, de nouveaux échecs thérapeutiques ont permis d'affiner ce seuil de corrélation *in vivo*/*in vitro* et de l'abaisser à 350nM (Savini, Bogreau et al. 2008).

📖 **P1**. **Musset L**, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 57: 110-115. *IF n+2: 4.716.*

Validation d'un marqueur moléculaire de résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone pour la surveillance

Le phénotypage *in vitro* des parasites est une méthode lourde nécessitant un équipement conséquent, du personnel formé à la culture cellulaire, la manipulation de radioéléments et surtout un acheminement des échantillons au laboratoire en moins de 4 jours pour permettre la survie des parasites. Pour faciliter la surveillance des résistances, mon deuxième objectif était de valider un marqueur moléculaire permettant d'identifier rapidement les parasites résistants à l'atovaquone. Certains auteurs avaient préalablement montré, chez des parasites résistants générés par pression médicamenteuse, que le gène codant le cytochrome *b* était impliqué dans la résistance à l'atovaquone. En collaboration avec les services de maladies infectieuses des Hôpitaux de Paris, j'ai participé à la mise en place d'un suivi systématique des patients traités par atovaquone/proguanil. Ainsi, entre février 2002 et septembre 2005, 10 échecs thérapeutiques parmi 469 patients suivis ont été identifiés. Les dosages plasmatiques de principe actif ont permis de montrer que les recrudescences précoces, avant J16, étaient liées à une mauvaise absorption de l'atovaquone alors que les échecs tardifs (<0,1%) étaient quant à eux liés à la présence de parasites hautement résistants à l'atovaquone *in vitro*. J'ai ainsi pu montrer que la résistance à l'atovaquone/proguanil était associée, au moment de la recrudescence, à la présence d'une mutation au niveau du codon 268 du gène codant le cytochrome *b* et que cette mutation induisait un très haut niveau de résistance *in vitro* (sensibilité 4000 fois plus faible). Cette mutation présentait cependant la particularité d'être indétectable au moment du diagnostic initial, avant la mise en place du traitement (J0).

📖 **P2**. **Musset L**, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect*, 2006. 8: 2599-2604. *IF n+2: 2.80.*
📖 **R1**. Le Bras J, **Musset L**, Clain J. Antimalarial drug resistance. *Med Mal Infect*, 2006. 36: 401-405. *IF n+2: 0.62.*

Élucidation du mécanisme d'émergence de la résistance à l'atovaquone-proguanil

Une fois le marqueur moléculaire validé et corrélé à l'efficacité thérapeutique, je me suis intéressée à l'histoire évolutive de la résistance à l'atovaquone/proguanil visant à comprendre pourquoi cette mutation était indétectable au moment du diagnostic initial à J0. Était-elle largement minoritaire dans la population parasitaire infectant le patient et donc indétectable par les méthodes de biologie moléculaire classiques ? Ou était-elle absente ?

Dans un premier temps, j'ai adapté une méthode utilisée en cancérologie pour la détection d'allèles rares (Kahn, Jiang et al. 1991). Elle est basée sur la neutralisation de l'amplification du génotype sauvage pour favoriser l'amplification du génotype mutant. Elle a permis, dans notre cas, d'atteindre une sensibilité de détection d'une copie mutante parmi 1000 copies sauvages. Elle n'a cependant pas permis d'identifier de parasites mutants chez nos isolats J0 issus de patients en échec thérapeutique.

Dans un deuxième temps, je me suis orientée vers l'analyse complète du génome mitochondrial des parasites isolés à J0 et de ceux isolés au moment de l'échec thérapeutique (Jx). Ce génotypage a ensuite été complété par l'analyse de cinq marqueurs microsatellites polymorphes situés sur différents chromosomes nucléaires. Ainsi six paires d'échantillons (cinq isolats, une souche de référence) ont pu être analysées et ont révélées une identité parfaite entre les séquences mitochondriales obtenues et les cinq marqueurs nucléaires analysés, à l'exception de la position 4294 du génome mitochondrial correspondant au codon 268 du gène du cytochrome *b* (Tableau 1).

Tableau 1. Diversité génétique parasitaire avant et après échec thérapeutique par atovaquone-proguanil.

		Génome mitochondrial[a]																			Microsatellite[b]				
		6 8 4 r	7 0 8 r	7 0 9 r	8 6 7 s	8 8 9 s	11 63 n	15 07 r	16 92 i	17 76 i	19 11 i	26 47 n	31 65 n	36 17 s	**42 94 n**	43 87 s	45 05 n	46 22 s	47 78 i	49 52 i	54 52 r	TAA87	TAA60	ARA2	PfPK2	TAA81
Patient[c]																										
Failures	IVC_1	D0	A	*	*	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	*	83	**89**	104	168	**178**
	IVC_1	D26	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**	.	.	.	.	.	*	83	89	104	168	178
	IVC_2	D0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	nd	83	77	101	171	175
	IVC_2	D39	.	*	*	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	T	T	83	77	101	171	175
	UPV_1	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	**.**	.	.	.	.	.	*	83	86	**110**	**174**	172
	UPV_1	D28	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	**C**	.	.	.	.	.	*	83	86	110	174	172
	UPV_2	D0	.	*	*	n	.	n	.	.	.	.	.	.	.	**.**	A	.	.	.	.	*	80	71	98	165	175
	UPV_2	D22	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**	A	.	.	.	.	*	80	71	98	165	175
	UPV_3	D25	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	.	*	80	86	104	**162**	**166**
	GUI_1	D0	.	*	*	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	**.**	.	.	G	.	.	*	92	86	104	165	178
	GUI_1	D26	.	*	*	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	**C**	.	.	G	.	.	*	92	86	104	165	178
	THA_1	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	**.**	.	.	.	.	.	*	95	77	104	165	175
	THA_1	Dfail	.	*	*	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	.	*	95	77	104	165	175

[a] Seules les positions mutantes sont représentées. La position 4294 en gras est associée à la résistance à l'atovaquone-proguanil (a4294g = Y268C ; a4294c = Y268S). s: mutation synonyme, n: mutation non synonyme, r: variation au niveau des séquences de l'ARNr, i: région intergénique. Les points représentent les identités avec la séquence de référence, les astérisques : l'absence d'insertion à cette position, nd: non déterminé.

[b] Taille de l'allèle en paire de base (pb) listées pour cinq marqueurs microsatellites ; en gras sont représentés les allèles dominants lorsque plus d'un allèle composait l'isolat.

[c] Chaque isolats en identifié par un code international en fonction du pays probable d'infection (IVC: Côte d'Ivoire, UPV: Burkina Faso, GUI: Guinée, THA: Thaïlande) suivi du nombre de jour suivant le premier jour du traitement par atovaquone-proguanil (D0 correspondant à l'isolat au moment du diagnostic, avant traitement). La séquence en haut correspond à la séquence de référence la plus fréquemment retrouvée chez les isolats africains (Joy, Feng et al. 2003) et obtenu à partir du numéro d'accession Genbank n°AY282977.

Compte tenu de la diversité des génomes mitochondriaux et des marqueurs microsatellitaires chez les parasites en provenance d'Afrique de l'Ouest, la probabilité que deux parasites d'origine différentes mais portant le même génotype à l'exception de la mutation 268 se retrouvent chez le même patient était extrêmement faible. J'ai ainsi pu montrer que la mutation de résistance n'était pas transmise à l'Homme lors de la piqûre du moustique, mais qu'elle apparaît indépendamment chez chaque patient à partir d'une population parasitaire transmise par le moustique initialement sensible. Ceci expliquait pourquoi la mutation

était indétectable à J0. Cette mutation aurait ensuite été sélectionnée par le traitement pour conduire environ 20 jours plus tard, à un échec thérapeutique.

L'étude des relations entre les différents profils génétiques mitochondriaux des parasites mutants a confirmé l'évolution parallèle (ou convergente) des parasites mutants chez des patients différents (Figure 4). Ce phénomène est couramment décrit chez les bactéries et les virus mais c'était la première fois qu'il était mis en évidence chez *P. falciparum* pour des mutations associées à une résistance. Chez les plasmodies, ce phénomène avait été observé uniquement dans le cas de variations du nombre de copies du gène *pfmdr1* en lien avec la résistance à la méfloquine (Nair, Nash et al. 2007).

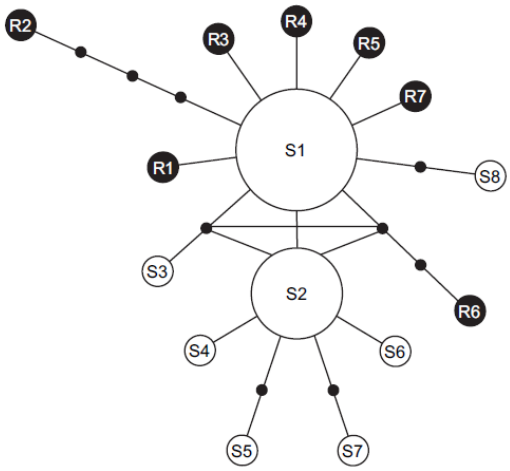


Figure 4. Réseau haplotypique des génomes mitochondriaux sensibles et résistants à l'atovaquone.

Les cercles blancs représentent les isolats sensibles à l'atovaquone-proguanil et les cercles noires, les isolats résistants. Seules les variations neutres ont été considérées. Les petits points noirs représentent les étapes évolutives manquantes. Les isolats sensibles analysés ont été choisis en fonction de la provenance des isolats résistants étudiés. Ils étaient au nombre de 28.

📖 **P3**. **Musset L**, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, 2007. 24:1582-1585. *IF n+2: 9.87. DOI: 10.1093/molbev/msm087*.

💬 **2005**. Au cours de ce travail, j'ai eu à effectuer mon premier co-encadrement d'un étudiant en master 1 en encadrant la réalisation de ses manipulations de biologie moléculaire et aidant à la rédaction de son mémoire de stage.

Origine évolutive des mutations du gène cytochrome *b* associées à la résistance à l'atovaquone-proguanil

Une fois l'évolution parallèle démontrée, nous avons cherché à savoir comment cette mutation est apparue chez le parasite et surtout comment elle s'est dispersée à l'ensemble des 20 copies du génome mitochondrial portées par chaque parasite. Ce que l'on observait chez les isolats provenant de patients en échec thérapeutique, c'est que ces derniers étaient toujours porteurs de parasites « tout mutant » (l'ensemble des copies du génome mutées) ou « non mutant » mais jamais de profils mixtes. Deux hypothèses ont donc été envisagées, soit la mutation était apparue spontanément chez le patient au cours de la multiplication clonale et au gré des erreurs de réplication, soit, comme cela a déjà été évoqué dans la littérature, l'atovaquone en elle-même procède un effet mutagène par production de radicaux oxygénés au moment de l'inhibition de la phosphorylation oxydative parasitaire (Srivastava, Morrisey et al. 1999).

En collaboration avec un biostatisticien, nous avons donc imaginé un modèle mathématique visant à prédire la diversité génétique mitochondriale générée par mutation aléatoire au cours de la phase d'expansion clonale érythrocytaire dans la population de parasites d'un patient puis à simuler l'effet de la pression médicamenteuse par atovaquone-proguanil sur ces mutations (Figure 5). L'objectif était de prédire l'évolution du nombre de copies mutées du gène impliqué (*pfcyt*b), chez un même parasite, et au sein de la population parasitaire circulant chez un patient, au cours de la phase de multiplication asexuée érythrocytaire. Enfin, ces prédictions ont été confrontées aux données observées chez les patients pour voir quel cas de figure était le plus probable.

Ce modèle nous a ainsi permis de montrer que l'évolution de la résistance à l'atovaquone chez un patient passe par un chemin inattendu et original. En effet, avant le début du traitement initial, chaque patient est porteur d'un réservoir de parasites mutants généré *de novo* à partir de la population initiale sensible au cours de la forte expansion clonale et ce, par le biais d'erreur de réplication. Les mutants sont donc très fréquents. Cependant, la taille du réservoir de parasites mutants est très variable d'un patient à un autre. D'abord indétectables, les mutants sont ensuite sélectionnés au cours de la phase de multiplication asexuée avant d'être pour la plupart détruits, par les concentrations initialement élevées d'atovaquone ou, par le système immunitaire du patient lui-même. Cependant, certains patients ne parviennent pas à éliminer tous leurs

parasites mutants. Dans ce cas, ils présenteront un échec thérapeutique dit tardif, généralement entre 16 à 20 jours après le début du traitement.

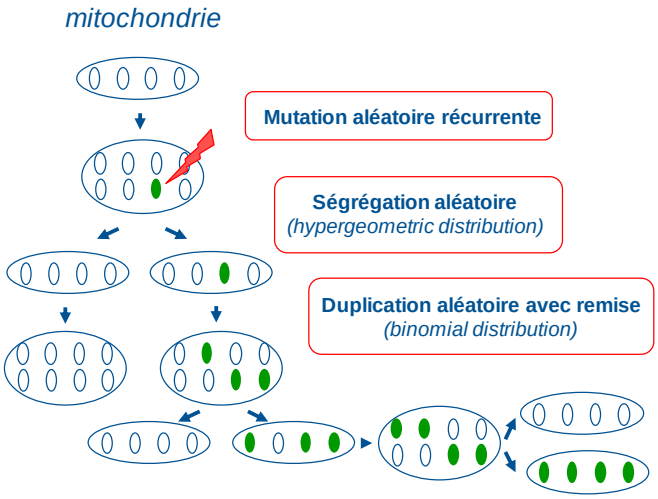


Figure 5. Principe du modèle utilisé.
Hypothèses testées : Apparition de la mutation selon la fréquence définie pour les plasmodies d'une mutation aléatoire à la position attendue. Trois fréquences ont été testées, 10^{-9} ; 10^{-10} et 10^{-11}. La ségrégation de cette mutation entre les différentes copies du génome a été calcée sur le processus de réplication de l'ADN propre à la mitochondrie proche de celui observé chez les bactériophages (Preiser, Wilson et al. 1996). La dispersion ou non de cette mutation à l'ensemble des copies du génome s'effectue par duplication aléatoire et dispersion à l'ensemble des copies selon la loi binomiale. Un taux de survie a été affecté aux parasites en fonction du nombre de copies mutantes portées par sa mitochondrie. Le nombre de copies du génome mitochondrial a également été testé selon différentes possibilités : 5, 10, 20 et 40 copies du génome.

📖 **P15**. Cottrell G, **Musset L**, Hubert V, Le Bras J, Clain J. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents Chemother*, **2014**. 58: 4504-4514. *IF n+2: 4.30. DOI: 10.1128/AAC.02550-13*.

💧 L'ensemble de ces travaux de recherche sur l'atovaquone-proguanil ont permis de mettre en évidence l'émergence *de novo* de la résistance à l'atovaquone-proguanil chez le patient et de démontrer la présence de la mutation quasi systématique chez tous les patients, avant le début de leur traitement, sans pour autant être systématiquement à l'origine d'un échec thérapeutique. Ces travaux ont aussi permis de souligner l'importance des concentrations initiales plasmatiques en molécule qui peuvent avoir un rôle non négligeable dans l'émergence/sélection des parasites résistants à un antipaludique.

L'originalité de ce travail était également d'avoir mis en évidence ce phénomène, en amont de l'utilisation de l'atovaquone-proguanil en zone d'endémie et donc en amont de la sélection/dispersion des parasites résistants. Jusque-là, les travaux visant à comprendre l'histoire évolutive de l'apparition/dispersion de la résistance, à la chloroquine (Wootton, Feng et al. 2002) et la sulfadoxine-pyriméthamine (Cortese, Caraballo et al. 2002), avaient été réalisés de manière rétrospective faute d'outils de biologie moléculaire disponibles.

En termes de santé publique, ces résultats laissent craindre une sélection rapide de parasites résistants chez les patients suite à leur traitement. Par conséquent, si cette association devait être déployée en zone d'endémie, une dispersion rapide et massive de la résistance sous l'effet de la pression médicamenteuse serait attendue.

Autour de cette thématique, une perspective serait d'étudier la transmission des parasites mutants, résistants à l'atovaquone, chez le moustique. Ce projet pourrait bénéficier des isolats de terrain adaptés à la culture cellulaire dont nous disposons à Cayenne mais également à Paris. Il s'agit de couple d'isolats, J0 sensibles et non mutants et Jx résistants et mutants *pfcytb* 268 que nous avons isolés des patients infectés en Amérique du Sud (n=4) ou en Afrique (effectif à déterminer). Il serait pertinent d'étudier leur transmission chez la souris humanisée *via* leur vecteur régional, respectivement, *Anopheles darlingi* ou *Anopheles gambiae.* Pour ce faire, une demande de financement co-construite avec mes collègues de l'unité Mère/Enfants face aux infections tropicales (UMR2016 IRD - Université Paris Descartes) et du CNR paludisme à Paris a déjà été évoquée.

Le gène *pfcrt* : marqueur de résistance à la chloroquine mais pas que….

Contrairement à la résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone-proguanil qui implique une mutation unique au niveau du gène *pfcytb*, la résistance à la chloroquine est, elle, liée à la présence de nombreuses mutations au niveau d'un gène codant un transporteur vacuolaire, *pfcrt* (chloroquine resistant transporter). Ce gène a été identifié à la fin des années 90 (Fidock, Nomura et al. 2000). C'est une combinaison de mutations qui est décrite comme étant responsable de la résistance à la chloroquine (Figure 6).

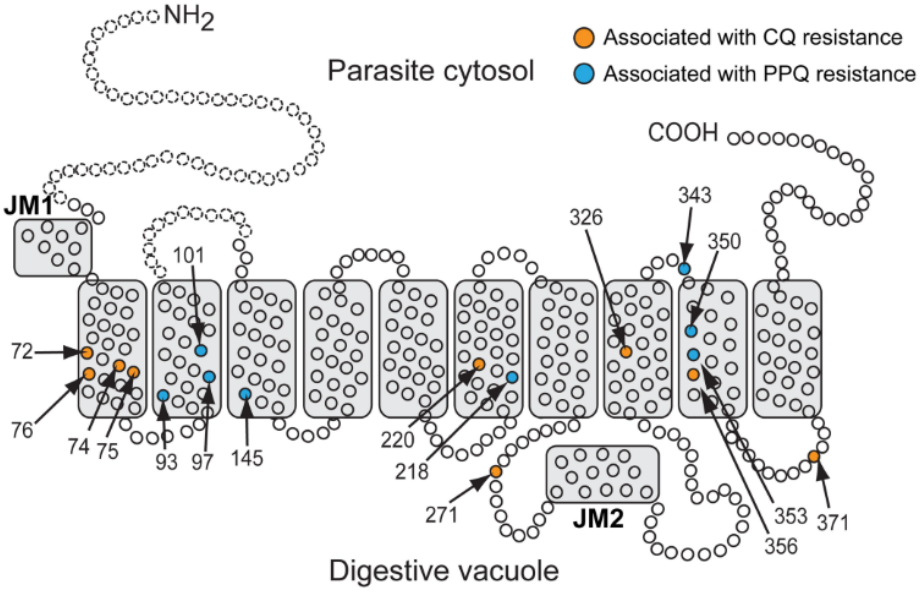


Figure 6. Mutations PfCRT impliquées dans la résistance à la chloroquine ou à la pipéraquine.

En orange les positions clés de la résistance à la chloroquine ; en bleu celles de la résistance à la pipéraquine.

Kim, Tan et al. 2019

A la suite de l'identification de ce gène, de nombreux isolats provenant des différentes zones d'endémie ont été séquencés et ont permis de mettre en évidence une grande variabilité d'allèles au niveau du gène *pfcrt* en fonction de leur origine géographique (Tableau 2, (Fidock, Nomura et al. 2000, Chen, Kyle et al. 2003, Durrand, Berry et al. 2004). Au total, 17 résidus sont potentiellement polymorphes. Les isolats résistants présentent chacun des allèles comportant de quatre à neuf mutations ponctuelles situées dans, ou à proximité, des régions potentiellement transmembranaires de PfCRT (Tableau 2). Ils ont cependant tous en commun d'être mutés en position 76, K76T.

Tableau 2. Allèles *pfcrt* observés en fonction de l'origine géographiques des isolats de *P. falciparum*.

Souche	Origine	Position PfCRT en acide aminé															
		72	74	75	76	97	144	148	160	194	220	271	326	333	350	356	371
3D7	Afrique	C	M	N	K	H	A	L	L	I	A	Q	N	T	C	I	R
7G8	Amérique du Sud	**S**	M	N	**T**	H	A	L	L	I	**S**	Q	**D**	T	C	**L**	R
Ecu1110	Equateur	C	M	N	**T**	H	A	L	L	I	**S**	Q	**D**	T	C	**L**	R
Dd2	Afrique	C	**I**	**E**	**T**	H	A	L	L	I	**S**	**E**	**S**	T	C	**T**	**I**
Camb734	Cambodge	C	**I**	**D**	**T**	H	**F**	**I**	L	**T**	**S**	**E**	N	**S**	C	I	R
PH2	Philippines	**S**	M	N	**T**	H	**T**	L	**Y**	I	A	Q	**D**	T	C	I	R

Cette diversité des allèles en fonction des zones géographiques a permis de retracer l'histoire évolutive de ce marqueur. En effet, les parasites résistants à la chloroquine ont émergés de façon indépendante mais quasi-simultanée dans différentes régions du monde, essentiellement en Asie du Sud-Est, Papouasie Nouvelle Guinée et Amérique du Sud avant de coloniser l'ensemble des zones d'endémie y compris africaines sous l'effet de la pression médicamenteuse (Awasthi and Das 2013).

Chemin évolutif pour aboutir à l'allèle équatorien du gène *pfcrt*

Porteurs de projet : *D. Fidock*
Collaboration : *C. Modchang, Mahidol University, Bangkok, Thailand*
Financement : *NIH R01*

Un de mes premiers objectifs au cours de mon postdoctorat dédié à l'étude de *pfcrt* était de retracer le chemin évolutif ayant abouti à l'allèle équatorien (Ecu 1110, K76T-A220S-N326D-I356L). C'est le faible nombre de mutations de cet allèle, quatre, qui nous a orienté vers cet haplotype (Tableau 2). Pour ce faire, nous avons modifié génétiquement une souche de référence sensible à la chloroquine, GC03 d'haplotype *pfcrt* 3D7, par recombinaison homologue après avoir généré les 16 plasmides regroupant toutes les combinaisons de mutations possibles. Chaque allèle ne variait du précédent qu'au niveau d'une seule position.

Pour mener à bien ce projet, j'ai utilisé une technique de recombinaison allélique qui nécessitait l'incorporation préalable d'une séquence cible de quelques paires de bases (AttB) dans les parasites à modifier. Une fois cette séquence intégrée, une deuxième transformation, rapide et ciblée cette fois au niveau de la séquence AttB, était requise (Nkrumah, Muhle et al. 2006). Dans un premier temps, il a fallu déterminer la meilleure position de la séquence AttB au sein des régions codantes. Elle a finalement été positionnée au niveau de l'intron 1 de *pfcrt*, assez éloignée des extrémités introniques pour ne pas gêner l'épissage des ARNm puis l'expression de la protéine (Figure 7).

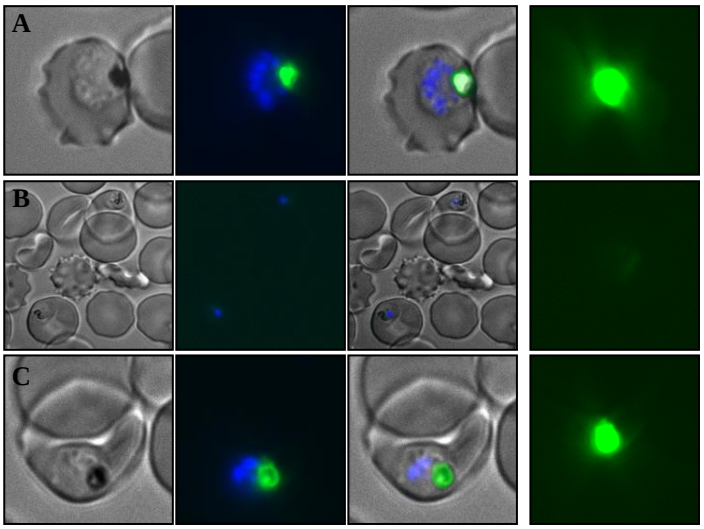


Figure 7. Impact de la séquence AttB sur l'expression du gène *pfcrt* marqué à la GFP.

A. Expression contrôle sans séquence AttB ;
B. Séquence positionnée à la fin de l'intron 1 ;
C. Séquence positionnée à 30pb de l'extrêmité 5' de l'intron 1.

La transfection de trois souches de référence m'a permis d'obtenir une intégration de la séquence AttB dans une souche. Malheureusement, cette transformation avait intégré deux copies du plasmide. De ce fait, lors de la deuxième intégration, le risque était que l'haplotype *pfcrt* s'intègre dans la région non exprimée du génome. J'ai dû quitter ce projet en cours pour rejoindre l'Institut Pasteur de la Guyane. Les parasites isogéniques ont cependant été générés par un autre post-doctorant. L'analyse des phénotypes de sensibilité à la chloroquine et du profil de croissance *in vitro* des différents transfectants ont permis de modéliser le chemin évolutif le plus probable ayant permis d'aboutir à Ecu 1110 et à la résistance à la chloroquine. Les résultats ont montré une apparition tardive de la mutation K76T alors que la mutation ayant le plus d'impact, seule, en termes de niveau de sensibilité était la mutation N326D. Seule l'association des quatre mutations permet d'aboutir à un niveau de résistance considérable. Compte tenu des profils de résistance observés, il semblerait que ce chemin évolutif ait été largement sous l'influence du métabolite de la chloroquine, la monodéséthyl-chloroquine, et de l'amodiaquine, un antipaludique utilisé en même temps que la chloroquine dans les années 50-60.

📖 **P25**. Gabryszewski SJ, Modchang C, **Musset L**, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial genetic modeling of *pfcrt*-mediated drug resistance evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, **2016**. 33: 1554-1570. *IF n+2: 10.22. DOI: 10.1093/molbev/msw037*.

Génotype *pfcrt* et phénotype de résistance à la chloroquine : importance du fond génotype parasitaire

Porteur de projet : *D. Fidock*
Financement : *NIH R01*

Le deuxième objectif de mon post-doctorat était de comprendre l'implication de l'haplotype sud-américain 7G8 dans le niveau de résistance des parasites à la chloroquine en fonction du fond génétique parasitaire. En d'autres termes, le génotype *pfcrt* est-il l'unique déterminant génétique de la résistance à la chloroquine ? Pour ce faire, plusieurs souches de référence sensibles (3D7 africaine, D10 de Papouasie Nouvelle Guinée et GC03), possédant des fonds génétiques variables ont été génétiquement modifiées au niveau de ce gène. Ce travail nous a permis de montrer que le gène *pfcrt* mutant, introduit dans une souche de référence sensible, induit des niveaux de réponse *in vitro* très variables allant de la résistance nette à la tolérance uniquement (Figure 8). La tolérance est ici caractérisée par une concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) inchangée, c'est-à-dire sensible, mais une CI_{90} nettement augmentée.

📖 **P6**. Valderramos S, Valderrramos JC, **Musset L**, Purcell L, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock D. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Path*. **2010**. 6: epub. *IF n+2: 8.14. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000887.*

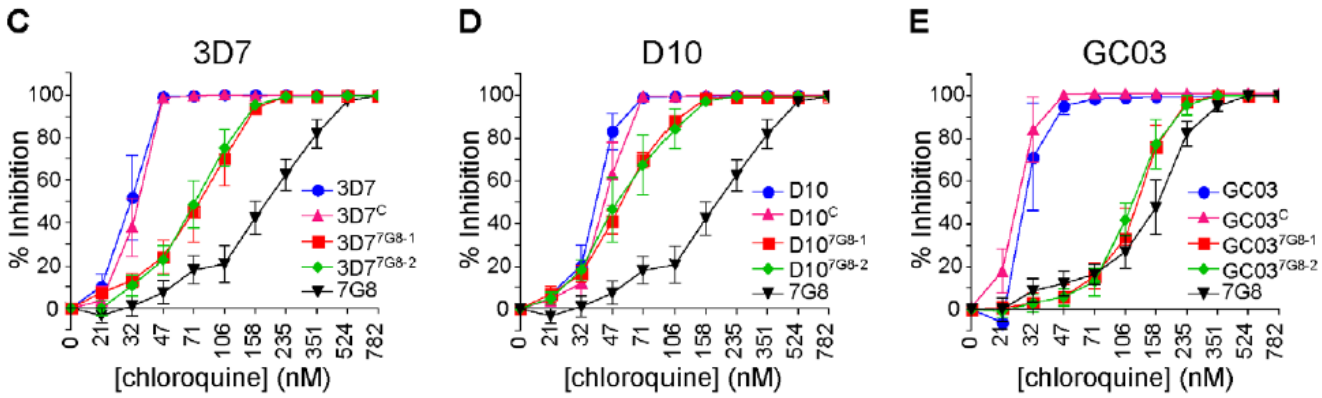


Figure 8. Sensibilité *in vitro* à la chloroquine de 3D7, D10 et GCO3 exprimant l'haplotype *pfcrt* 7G8.
Les courbes bleues représentent les courbes effet/dose des souches non modifiées, les courbes roses des souches modifiées par le génotype contrôle 3D7, les courbes rouges et vertes deux clones distincts exprimant le génotype *pfcrt* de résistance 7G8. Les courbes noires représentent la souche de référence 7G8 non modifiée.

Le retour de la sensibilité à la chloroquine en Guyane : une histoire évolutive originale chez *Plasmodium falciparum*

Porteur de projet : *L. Musset.*
Collaborations : *D. Neafsey, Broad Institute, Cambridge, USA*
D. Fidock, Département de Microbiologie, Université Columbia, New-York City, USA
Financement : *Santé Publique France, ANR CEBA (Oemarquine, PlasmoDynEvol), STRonGer FP7.*

Ma prise de poste en tant que responsable adjointe du laboratoire de parasitologie à Cayenne m'a permis de poursuivre ce travail autour de *pfcrt* et de continuer à travailler en collaboration avec Columbia University, d'un côté sur des souches de référence et de l'autre sur des isolats de terrain. En effet dans le même temps, l'équipe du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane (IPG) observait chez les isolats de Guyane, l'allèle 7G8 (72S, **76T**, 220S, 326D et 356L) de *pfcrt* prédominant, voire fixé dans la population parasitaire alors que 70% des isolats étaient sensibles *in vitro* à la chloroquine.

Deux hypothèses étaient envisageables pour expliquer l'absence de résistance à la chloroquine en présence de la mutation *pfcrt* 76T. La première était que la mutation *pfcrt* K76T est nécessaire mais pas suffisante pour conférer la résistance. Cette première hypothèse permettait d'expliquer les contradictions observées lors d'études épidémiologiques de terrain (Basco and Ringwald 2001, Thomas, Ndir et al. 2002). La seconde était qu'un phénomène de réversion de la résistance, permettant d'améliorer la valeur sélective des parasites, aurait eu lieu en Guyane à la suite de la diminution de la pression médicamenteuse par la chloroquine.

La première phase de ce travail a consisté à adapter à la multiplication *in vitro* des isolats de terrain, de les cloner puis de les caractériser génotypiquement (analyse génome entier) et phénotypiquement (test de chimiosensibilité *in vitro*). Au total, 54 isolats ont été séquencés et 35 d'entre eux ont été inclus dans une étude d'association pangénomique qui a permis d'associer de façon robuste une mutation au niveau de *pfcrt*, C350R, avec le niveau de sensibilité à la chloroquine (Figure 9A). De façon à valider biologiquement ce marqueur, cette mutation a été introduite dans une souche de référence brésilienne génétiquement proche des isolats circulants en Guyane, 7G8 (Figure 9B). Une étude rétrospective portant sur 573 échantillons collectés en Guyane entre 1998 et 2014 et conservés dans notre collection d'ADN du CNR a alors été menée (Figure 9C). Cette dernière a permis de montrer que les parasites porteurs de cette mutation sont apparus en 2003 avant de rapidement diffuser à l'ensemble de la population parasitaire guyanaise (Figure 9D).

C'est donc bien un phénomène de réversion de la résistance qui a eu lieu par l'intermédiaire d'une mutation ponctuelle compensatoire, C350R. Nous avions à cette époque émis l'hypothèse de cette mutation avait été sélectionnée car elle permettait d'améliorer la valeur sélective des parasites en présence d'une faible pression médicamenteuse par la chloroquine.

📖 **P8**. Legrand E, Yrinesi J, Ekala MT, Peneau J, Volney B, Berger F, Bouchier C, Bertani S, **Musset L**, Meynard JB, Puijalon O. Discordant temporal evolution of *Pfcrt* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum in vitro* drug susceptibility to 4-aminoquinolines after changing drug policy in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**. 56: 1382-1389. *IF n+2: 4.48. DOI: 10.1128/AAC.05280-11*.

📖 **P21**. Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel *pfcrt* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**. 112: 11672-11677. *IF n+2: 9.66. DOI: 10.1073/pnas.1507142112*.

💬 **2011-2015**. Ce travail a été effectué avec l'implication d'un post-doctorant et d'une étudiante en master 1.

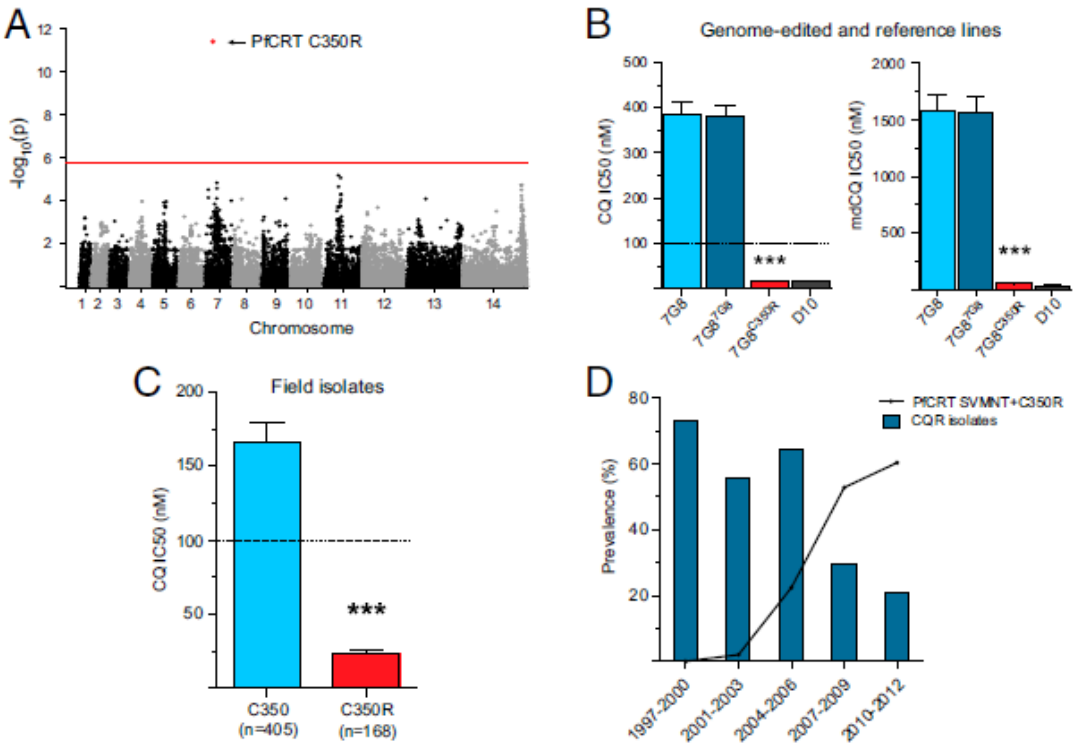


Figure 9. Réversion de la résistance à la chloroquine en Guyane, caractérisation et temporalité.
A. Manhattan plot mettant en évidence l'association de la mutation *pfcrt* C350R et le phénotype de sensibilité à la chloroquine (n=35 génomes). **B.** Validation biologique de l'association génotype/phénotype par modification génétique homologue d'une souche de référence sud-américaine 7G8. *** p<0,0001. Seuil *in vitro* de résistance à la chloroquine : 100nM. **C.** Etude rétrospective de 573 isolats collectés en Guyane en fonction de leur sensibilité *in vitro* à la chloroquine. ***p<0,0001. Seuil *in vitro* de résistance à la chloroquine : 100nM. **D.** Diminution de la prévalence des parasites résistants à la chloroquine de manière inversement proportionnelle à la prévalence de la mutation *pfcrt* C350R en Guyane entre 1997 et 2012.

TRACQSA: Tracking the spread of CQR reversion in South America thought the mutation C350R of *pfcrt*

Porteur du projet : L. Musset

Collaborations : Marcello Ferreira,University de Sao Paulo
Marcus Lacerda, Fondation de Médecine Tropicale, Manaus
Horace Cox, Programme national de lutte contre le paludisme, Guyana
Malti Adhin, Faculty of Medical Science, Paramaribo, Suriname
Dionicia Gamboa, Universidad peruana cayetano Heredia, Pérou
Herrera Socrates, CICAC, Cali, Colombie.

Financements : ANR CEBA (Oemarquine, PlasmoDynEvol)

A la suite de l'identification de cette mutation, une étude rétrospective portant sur des isolats collectés entre 2013 et 2015 a cherché à évaluer la répartition géographique de cette nouvelle mutation à l'échelle continentale. Il semblerait que cette mutation soit spécifique du plateau des Guyanes (Figure 10).

Une analyse de la diversité génétique autour du marqueur *pfcrt* a été initiée mais non finalisée pour l'instant de façon à déterminer l'origine des révertants.

2013-2015. Ce travail a été effectué en collaboration avec quatre étudiants, deux, niveau master 2 et deux, niveau BTS accueillis au laboratoire.

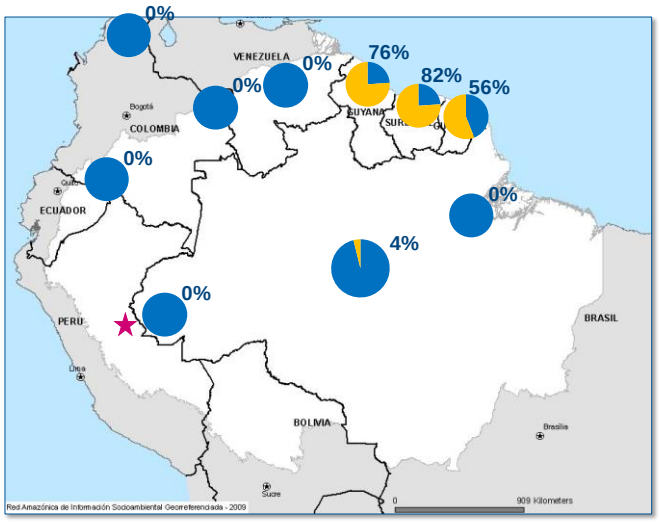


Figure 10. Répartition de *pfcrt* C350R en Amazonie.

Déploiement de l'Eurartésim® en Guyane, des échecs thérapeutiques et, ... *pfcrt* ?

Porteurs du projet : L. Musset, F. de Laval Service de Santé des Armées
Collaboration : N. Taudon, IRBA Brétigny sur Orge
Financement : Santé Publique France

En 2011, l'Eurartésim®, association de dihydro-artémisinine et pipéraquine, obtient son AMM en Europe et son remboursement en France en 2014. Ainsi, en 2016, le 3ème Régiment d'Etranger d'Infanterie (REI) basé à Kourou, commence à l'utiliser pour traiter les légionnaires infectés par *P. falciparum* de retour des zones orpaillées où ils luttent contre l'orpaillage clandestin.

Le Centre National de Référence, en collaboration avec le service de santé des armées, a mis en place un suivi systématique des militaires sous traitement. Entre 2016 et 2018, sept patients ont été traités par Eurartésim® et quatre ont présenté des recrudescences parasitaires entre J22 et J30 malgré un traitement déclaré bien suivi.
Les dosages plasmatiques ont permis d'identifier trois cas de résistance parasitaire à la pipéraquine. Le nombre de copies du gène de la plasmepsine, connu pour être impliqué dans le mécanisme de résistance à la pipéraquine en Asie du Sud-Est (Witkowski, Duru et al. 2017), ne montrait pas d'association particulière avec la résistance. Les trois isolats associés aux échecs thérapeutiques portaient la mutation *pfcrt* C350R et pour deux d'entre eux, étaient résistants *in vitro* à la pipéraquine en utilisant la nouvelle méthode de phénotypage PSA (Piperaquine Survival Assay).
Ces résultats décrivent pour la première fois des échecs thérapeutiques à un ACT en Amérique du Sud liés à une résistance de la molécule partenaire, la pipéraquine, sans résistance associée à l'artémisinine (tests RSA sensibles et *pfk13* non mutant).

P ? Sauthier S, de Laval F, Morin F, Taudon N, **Musset L**. Dihydroartemisinin-Piperaquine treatment failures in absence of *pfk13* mutation but associated with *Plasmodium falciparum in vitro* resistance to Piperaquine in Amazonia. En cours de préparation.

2018-2019. Ce travail de caractérisation et de rédaction d'une première correspondance a été effectué en lien avec une étudiante de niveau licence/master 1.

D'après ces résultats préliminaires, il semblerait que la mutation C350R de *pfcrt*, initialement décrite comme impliquée dans la réversion de la résistance à la chloroquine, ait été finalement sélectionnée lors de l'utilisation de la pipéraquine. Ces résultats vont également dans le sens des dernières publications parues sur la structure de la protéine PfCRT (Kim, Tan et al. 2019). Cette publication décrit au niveau atomique le mécanisme de résistance à la chloroquine et la pipéraquine de *pfcrt* en lien avec les mutations identifiées à travers le monde, notamment en Asie. Ainsi, l'introduction d'une arginine en position 350 réduit la charge négative au sein de la cavité et diminue son affinité pour la pipéraquine.

La pipéraquine est utilisée par les orpailleurs depuis le début des années 2000 car ils s'automédiquent avec de l'Artecom®, une trithérapie non recommandée qui associe, dihydro-artémisinine, pipéraquine et triméthoprime. Au sein du laboratoire, une postdoctorante explore actuellement cette question du lien entre la mutation *pfcrt* C350R et la résistance à la pipéraquine en tentant de générer des lignées isogéniques *pfcrt* C350R sauvages ou mutantes dans des isolats de Guyane et en analysant le génome de parasites PSA sensible ou résistant pour confirmer ou non l'implication, seule ou associée à d'autres marqueurs, de cette mutation. Concernant l'amplification des gènes plasmepsine 2 et 3, les résultats préalablement obtenus laissent penser que ce n'est pas le principal marqueur de la résistance à la pipéraquine en Guyane (Witkowski, Duru et al. 2017). Si l'implication de *pfcrt* se confirme, les résultats obtenus mais non valorisés dans le cadre de l'étude TRACQSA seront exploités à ce moment là de façon à renforcer la publication à venir. Par ailleurs, sur la base des différents génomes entiers dont nous disposons pour des isolats de Guyane et du Guyana, nous tenterons de comprendre si l'émergence de cette résistance est unique ou multiple sur le plateau des Guyanes.

2015-2018. Les données préliminaires plasmepsine ont été obtenues avec l'aide de quatre étudiants, un étudiant en 3ème année de pharmacie, deux en 3ème année d'école d'ingénieur et un en 2ème année de licence. Ils ont été chacun impliqués dans la mise au point de la méthode ou l'analyse séquentielle d'échantillons.

Ce travail sur le *pfcrt* gène a débuté dans le simple but d'approfondir nos connaissances sur ce gène puisque la chloroquine n'était déjà plus utilisée pour traiter *P. falciparum*. L'objectif était, entre autres, de comprendre le chemin évolutif pris par le parasite pour aboutir aux allèles de résistances qui circulent actuellement dans le monde. Cependant, de fil en aiguille, nos résultats nous orientent vers d'autres molécules, généralement de la même famille mais qui sont quant à elles d'actualités et utilisées en thérapeutique. Cette protéine vacuolaire, PfCRT par laquelle passent de nombreux antipaludiques n'a pas encore fini de nous étonner.

Résistance aux dérivés de l'artémisinine, REAGIR si l'histoire se répète

En 2001, les associations à base de dérivés de l'artémisinine ont été déployées et recommandées par l'OMS comme première ligne de traitement des accès à *P. falciparum*. Ces associations de deux antipaludiques présentent l'avantage de retarder la sélection de parasites résistants grâce à la diminution rapide de la biomasse parasitaire liée à l'action immédiate de l'artémisinine (White 1997). Cette action rapide (10 000 fois moins de parasites en 48h) a été mise à profit avec l'autorisation d'administrer dans les cas graves de l'artésunate en intraveineux. Cela a permis de réduire le nombre de décès par neuropaludisme (Talman, Clain et al. 2019). En Guyane, c'est en 2007 que la première association à base d'artémisinine a été déployée, le Riamet®, une association d'artéméther et de luméfantrine. Elle a été rejointe en 2016 par l'Eurartésim®.

La demi-vie courte des artémisinines, qui plus est, associée à une autre molécule, ne laissait pas présager une sélection de parasites résistants rapide. Cependant, c'est en 2008 qu'au Cambodge les premiers signes de diminution de sensibilité ont été décrits (Noedl, Se et al. 2008). Cette diminution de sensibilité se traduisait par un retard de clairance parasitaire mesurable en prélevant le patient régulièrement (toutes les 6 à 8 heures) pour déterminer la parasitémie et calculer le temps de clairance parasitaire. Ce retard de clairance se traduisait également par une parasitémie encore positive trois jours après le début du traitement. La définition actuelle de l'OMS de la résistance à l'artémisinine correspond donc à un retard de clairance parasitaire après un traitement par l'artésunate en monothérapie ou après un traitement par une ACT (World Health Organization 2018d). Cette résistance est dite partielle car la majorité des patients, même infectés par des parasites dits résistants, est capable de les éliminer après traitement. Elle est dite partielle aussi car elle n'affecte que les parasites au stade ring. Ainsi, *in vitro*, une nouvelle méthode de phénotypage, le test RSA (Ring Survival Assay), a été mise au point pour la mesurer (Witkowski, Amaratunga et al. 2013). Elle utilise des parasites synchronisés au stade ring, dans une fenêtre de temps très courte, entre 0 et 3h. Elle peut être réalisée assez facilement sur des échantillons fraîchement prélevés (méthode *ex vivo*) ou avec beaucoup de contraintes horaires sur des isolats adaptés à la multiplication *in vitro* (méthode *in vitro*). C'est l'utilisation de cette méthode qui a permis en 2014 d'identifier un marqueur moléculaire de résistance aux artémisinines en Asie du Sud-Est, des mutations ponctuelles, généralement uniques, présentes au niveau de la région propeller du gène *pfk13* (Ariey, Witkowski et al. 2014). Rapidement après son identification, l'épidémiologie de ce gène a commencé à être décrite dans le monde (📖 **P28**).

Sur le plateau des Guyanes, l'année 2013 a été marquée par une alerte liée à l'identification de patients présentant des retards de clairance parasitaire, 31% et 57% respectivement, au Suriname et au Guyana (Vreden, Jitan et al. 2013). Bien que la qualité des lectures faites à J3 puisse être discutée, nous avons en 2015 identifié la mutation *pfk13* C580Y, marqueur majoritaire de résistance en Asie du Sud-Est (WHO 2018), chez des isolats collectés au Guyana en 2010 (📖 **P24**).

Dans ce contexte, il nous est apparu fondamental de maîtriser les dernières techniques de phénotypage par RSA au laboratoire. Nous maîtrisions déjà la modification génétique des plasmodies par recombinaison homologue et disposions d'une collection d'isolats de parasites adaptés à la multiplication *in vitro* importante. Sur cette base, nous avons développé un nouvel axe de recherche visant à : i) caractériser dans le temps et dans l'espace le gène *pfk13* sur le plateau des Guyanes, ii) valider certaines mutations du gène *pfk13* comme marqueur de résistance dans la région et, iii) étudier le fitness des parasites mutants *pfk13* en Amazonie.

📖 **P24**. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalall K, Ceron N, **Musset L**, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. Independent Emergence of the *Plasmodium Falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis*. **2015**. 213: 1472-1475. *IF n+2: 5.19. DOI: 10.1093/infdis/jiv752.*

Préambule au sujet du projet européen ELIMALAR

Porteur de projet :	*L. Musset*
Collaborations :	*E. Mosnier, Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne* *F. Djossou, Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de Cayenne*
Budget global :	*1 159 335€*
Financements :	*FEDER Europe 586 014€, ARS Guyane 94 118€, Rotary Club International 65 172€, OMS 15 946€, Hôpital de Cayenne et Ministère de la recherche.*

Ce projet collaboratif de recherche en santé publique, innovant et fort de complémentarité entre ses acteurs, vise à évaluer différentes approches/outils pour améliorer la lutte contre le paludisme sur le Plateau des Guyanes et tendre le plus rapidement possible vers son élimination. Il a pour finalité d'orienter et d'accompagner les décideurs en santé publique au passage de la phase de contrôle de la maladie à une phase d'élimination du paludisme en Guyane. Ce changement de phase implique de cibler les patients asymptomatiques porteurs de parasites dans les poches résiduelles de transmission afin de la stopper définitivement. Que les approches soient ciblées ou généralistes, elles reposent sur des méthodes diagnostiques performantes et des traitements fiables et efficaces.

Ainsi, ce projet inclut deux axes :

1. **REAGIR** : Résistance/Emergence aux Artémisinines et ses partenaires sur le plateau des Guyanes, les Identifier pour mieux les faire Reculer. Ces associations sont aujourd'hui recommandées dans le monde entier y compris sur le plateau des Guyanes pour traiter les patients mais, sont-elles toujours efficaces et si oui, pour combien de temps ?
2. **PALUSTOP** : pour définir si la mise en place d'un dépistage actif ciblé associé à un traitement de toutes les personnes positives vivant dans une zone de transmission en Guyane est efficace et réalisable.

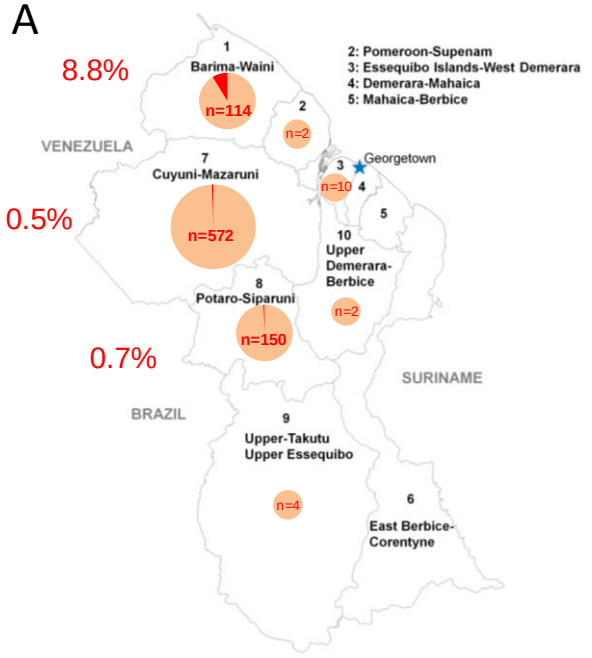
J'expose ce projet avant de détailler l'axe REAGIR dans le détail car il inclut une grande partie de mes activités de recherche ces dernières années et est structurant pour le laboratoire puisqu'il apporte des ressources non négligeables. Initié dès 2015, le montage administratif de ce projet s'est révélé complexe et chronophage. Administrativement, il a d'ailleurs pris beaucoup de retard et est aujourd'hui prolongé jusqu'en décembre 2021. Il a débuté scientifiquement en septembre 2017 autour de l'axe PALUSTOP (cf p. 71) et en janvier 2017 concernant l'axe REAGIR.

Résistance de *P. falciparum* aux artémisinines au Guyana, un site d'émergence made in Amazonie

Porteur du projet :	*L. Musset*
Collaborations :	*Vector Control Program, Ministère de la Santé, Georgetown, Guyana* *D. Fidock, Columbia University Medical Center, New York, USA* *D. Neafsey, Harvard University, Boston, USA* *K Udhayakumar, Malaria branch, CDC, Atlanta, USA*
Financements :	*OMS, FEDER ELIMALAR, ARS Guyane, Ministère de la recherche*

En 2016-2017, nous avons analysé 854 isolats en provenance du Guyana parmi lesquels nous avons identifié 14 mutants *pfk13* C580Y soit 1,6% IC_{95} [6,73 – 21,27]. Les mutants étaient retrouvés préférentiellement dans la région administrative n°1 (Région 1) à la prévalence moyenne de 8,8%, pouvant atteindre 20% certains mois de l'année (Figure 11A). Cette région est une zone minière du Guyana où l'utilisation des antipaludiques est parfois aléatoire et peut inclure des monothérapies à base de dérivés d'artémisinine. Une analyse des marqueurs microsatellites autour de *pfk13* a été réalisée pour 13 de ces mutants. Les résultats ont montré une origine commune et identique aux mutants de 2010, Guyana A et Guyana B (Figure 11B).

A



B

Name	Region	Year of collection	-31.9	-6.36	-3.74	-0.15	K13[1]	3.4	8.6	15.1	72.3
T145	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T237	7	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T244	1	2016	203	280	170	NA	C580Y	138	NA	144	NA
T305	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T345	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T364	1	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T378	1	2016	203	277	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T385	7	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T445	1	2016	203	277	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T490	7	2016	203	280	170	206	C580Y	NA	262	144	244
T508	8	2016	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
T314	1	2016	NA	NA	NA	NA	C580Y	NA	NA	NA	NA
T649	1	2016	NA	NA	NA	NA	C580Y	NA	NA	NA	NA
GUY0183	1	2017	ND	ND	ND	ND	C580Y	ND	ND	ND	ND
T208	7	2016	203	280	152	192	WT	138	284	138	244
T265	7	2016	203	280	156	192	WT	102	262	144	238
T317	1	2016	NA	NA	156	190	WT	NA	262	144	244
T332	7	2016	NA	NA	154	190	WT	102	262	144	244
T504	8	2016	203	280	152	192	WT	138	284	138	244
T524	7	2016	NA	NA	170	192	WT	102	270	NA	NA
T634	8	2016	205	280	156	192	WT	102	262	144	238
T724	8	2016	203	280	154	192	WT	NA	284	138	240
Guyana A*	1&7	2010	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	244
Guyana B*	7	2010	203	277	170	206	C580Y	138	262	144	240
MRA 1236*		2010	201	283	146	194	C580Y	130	286	138	NA
MRA 1240*		2011	201	283	146	194	R539T	122	264	138	244
MRA 1241*		2011	201	283	146	194	I453T	130	290	138	244
3D7			207	283	164	226	WT	160	274	147	242
7G8			225	280	158	196	WT	102	262	144	240

Figure 11. Mutation *pfk13* C580Y au Guyana, 2016-2017, répartition (A) et origine (B).

A. Prévalence des mutants observés dans les Régions 1, 7 et 8 du Guyana en fonction du nombre total d'isolats analysés. **B.** Analyse des marqueurs microsatellites autour de *pfk13* des mutants 2016-2017 en comparaison des mutants 2010 du Guyana, haplotypes A et B (Chenet, Akinyi Okoth et al. 2016) et des mutants cambodgiens (MRA). [1]Région propeller du gène analysée: codons 438-704. Position des marqueurs microsatellites exprimée en kilobase en amont ou en aval du gène *pfk13*. NA: Pas d'amplification, ND: Non réalisé.

Un séquençage du génome entier de 53 de ces isolats incluant 13 mutants et 3 à 4 isolats non mutants appariés dans le temps et dans l'espace aux mutants a permis de mettre en évidence une émergence indépendante de celle d'Asie du Sud-Est ainsi qu'une expansion clonale de ces derniers (Figure 12A).

Pour confirmer ou non l'implication de cette mutation dans la résistance aux artémisinines chez des isolats sud-américains, elle a été, ainsi que la mutation R539T, insérée dans deux isolats de Guyane (O141-A année 2011 et R086 année 2014) en utilisant la méthode des nucléases à doigts de zinc (Zinc-Finger Nuclease (ZFN)). R539T avait été choisi car c'était le phénotype de résistance le plus marqué chez les isolats du sud-est asiatique et C580Y parce que nous l'avions identifié au Guyana (Chenet, Akinyi Okoth et al. 2016). Des lignées isogéniques ont ainsi été générées et clonées avant d'être phénotypées par RSA. La présence des mutations C580Y ou R539T dans le gène *pfk13* des isolats guyanais confèrait une résistance marquée *in vitro* aux dérivés de l'artémisinine avec des valeurs de survie respectivement de 0,6% ±0,2 pour R086 et 13,7% ±1,5 pour R086^{C580Y} (p=0,006), 0,5% ±0,1 pour O141-A et 27,6% ±7,0 pour O141-A^{C580Y} (p=0,03) ou encore 0,6%±0,2 contre 33,0% ±5,0 chez R086^{R539T} (p=0,011) (Figure 12B). Pour mémoire, le seuil de diminution de sensibilité pour l'interprétation des tests RSA, dit de survie, est fixé à 1%.

Pour analyser l'impact de ces mutations sur le fitness des parasites, des tests de compétition de croissance ont été réalisés entre les lignées parentales et mutées. Ces tests consistaient à mélanger à J0 une même proportion des parasites mutés et leurs parents afin de suivre l'évolution de la composition de la culture tous les deux jours pendant 60 jours. Les tests ont été réalisés en duplicat et deux fois de suite. La proportion des parasites mutants contenus dans la culture a été déterminée par PCR en temps réel tous les deux jours. Les résultats de ces tests montraient une baisse de la proportion des mutants au fil des cycles de multiplication (Figure 12C). Cette diminution était plus marquée pour la mutation C580Y intégrée dans l'isolat O141-A. La différence de fond génétique entre O141-A et R086 pouvait expliquer cette différence d'impact d'une même mutation sur la croissance des parasites. Quoiqu'il en soit, la mutation C580Y avait un impact significativement négatif sur la multiplication parasitaire comparé aux parasites sauvages (Figure 12D). Cet impact était compris entre -0,6 et -1,3% par génération.

📖 **P43** Mathieu L, Cox H, Early A, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi N, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre J, Demar M, Ringwald P, Neafsey D, Fidock D, **Musset L**. Local emergence in Amazonia of Plasmodium falciparum k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife*. **2020**. 9 :e51015. *IF n-1: 6.83. doi: 10.7554/eLife.51015*.

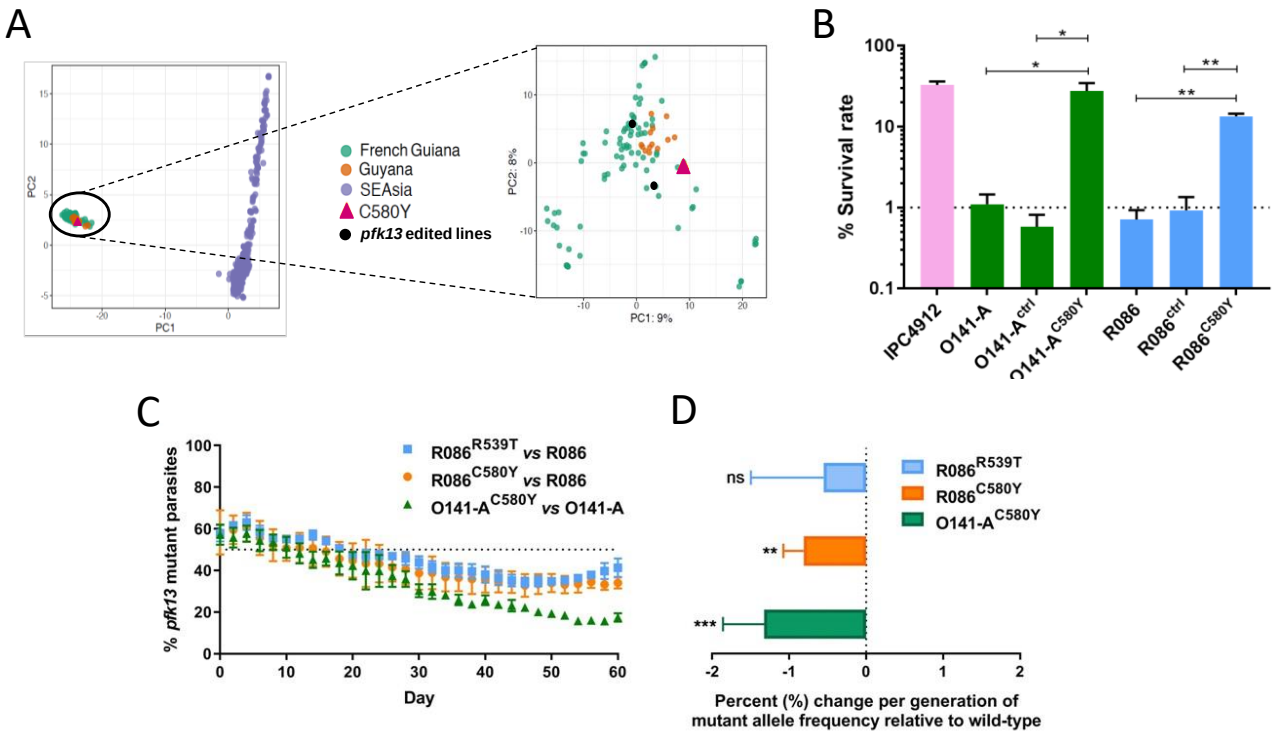


Figure 12. Caractérisation des mutants *pfk13* C580Y, Guyana, 2016-2017.

A. Analyse en composante principale des parasites du Guyana comparés à ceux de Guyane et d'Asie du Sud-Est basée sur les mutations ponctuelles observées au travers du génome parasitaire. Les parasites de Guyane et du Guyana (deux pays géographiquement proches) forment un groupe homogène différent de ceux d'Asie. **B.** Taux survie des souches isogéniques O141-A et R086. IPC4912 est une souche cambodgienne témoin de résistance mutée *pfk13* I543T. Les taux de survie ont été déterminés entre 0 et 3 heures post-invasion après une exposition de 6 heures à 700nM de dihydroartémisinine et mesuré par microscopie 66 heures après. L'écart-type a été déterminé sur la base d'au moins 3 réplicats. Les lignées parentales possèdent un gène *pfk13* sauvage, les contrôles (ctrl) cinq mutations silencieuses au niveau de *pfk13* introduites par la méthode des nucléases en doigt de zinc. Enfin, les lignées C580Y et R539T possèdent ces mutations ainsi que les cinq mutations silencieuses. Une souche est considérée comme résistante si son taux de survie est supérieur à 1%. Le test t de Student a été utilisé pour déterminer le degré de significativité des différences avec les taux de survie parentaux : *p<0,05; **p<0,01. **C.** Fréquence allélique des mutants au cours des tests de compétition de croissance déterminée par PCR en temps réel sur une période de 60 jours tous les deux jours. Les valeurs représentent les pourcentages de mutants *pfk13*. L'écart-type a été determiné sur la base de deux réplicats biologiques et deux réplicats techniques. Un pourcentage inférieur à 50% indique que les mutants sont moins aptes à la multiplication que les sauvages. **D.** Pourcentage de changement par génération du mutant par rapport au sauvage. Cette différence a été calculée en fonction de la moyenne des fréquences alléliques sur 60 jours. Les écart-types ont été calculés sur la base de deux réplicats biologique pour chaque co-culture. Le degré de significativité a été calculé en utilisant le test de Wilcoxon ** p<0,01, *** p<0,001; ns: non significatif.

Deux études d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'artéméther-luméfantrine ont été conduites au Guyana en espérant mesurer l'impact de ces mutants sur l'efficacité thérapeutique de l'association. En 2014, une première étude avait déjà été réalisée mais n'avait pas permis de mettre en évidence de mutants, de retard de clairance ou d'échec thérapeutique (📖 **P30**). La deuxième étude en 2018-2019 incluait les patients à Georgetown, la capitale, et Port Kaituma, une des principales villes de la Région 1. Sur 173 patients inclus (99 à Georgetown et 74 à Port Kaituma), aucun n'était porteur de parasites mutants *pfk13* C580Y. Cinq échecs thérapeutiques ont été observés, un lié à une réinfection et quatre autres à une résistance probable de la molécule partenaire si on considère que le traitement a été correctement pris et absorbé. Aucun dosage pharmacologique n'a pu être réalisé pour valider les concentrations médicamenteuses plasmatiques. J'ai participé à cette étude pour caractériser génétiquement ces recrudescences et les parasites associés mais également comme conseiller technique de l'OMS sur place pour auditer et superviser l'étude en cours de réalisation.

📖 **P30** Rahman R, Martin MJ, Persaud S, Ceron N, Kellman D, **Musset L**, Carter KH, Ringwald P. Continued Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to Artemisinin in Guyana, With Absence of Kelch Propeller Domain Mutant Alleles. **2016**. *Open Forum Infect Dis*. 30: epub. *IF n+3: 3.37. DOI: 10.1093/ofid/ofw185.*

Epicentre de la résistance et risques de dispersion associés

Porteur du projet : *L. Musset*
Collaborations : *H. Cox - Ministère de la santé publique du Guyana*
M. Magris, Vénézuela
M. Lacerda, W. Monteiro Fondation de Médecine Tropicale Hector Dourado, Manaus, Brésil
Financements : *PAHO-WHO, Guyamazon III, FEDER ELIMALAR*

Alors que les signaux en provenance du Guyana montraient un début de sélection de la résistance dans les régions où les antipaludiques sont utilisés de manière erratique, nous avons choisi d'analyser l'ensemble des isolats de *P. falciparum* dont nous disposions en provenance de la région est amazonienne. Ainsi, plus de 1000 isolats en provenance de Guyane, de Manaus au Brésil et du Vénézuela ont été génotypés au niveau du gène *pfk13* (Figure 13). Une mutation A481V a été identifiée dans la région propeller de *pfk13* chez un isolat de Manaus. Cette mutation n'entraîne visiblement pas de retard de clairance majeur chez les patients (WWARN 2019). L'étude du polymorphisme naturel de la région non active du gène (partie 5') a permis d'identifier un polymorphisme naturel présent au niveau de la position 189 avec une lysine substituée en thréonine (K189T) ains qu'une mutation R255K. Tous les isolats de la région de Manaus présentent la mutation K189T, 78% au Vénézuela, 47% au Guyana et seulement 32% en Guyane. Cette mutation est également décrite dans des isolats africains notamment au Sénégal. Au-delà de ces nouveaux isolats, une analyse des données de la littérature a été effectuée de manière à avoir une vision exhaustive des génotypes disponibles. Bon nombre de ces résultats ont été obtenus au sein de notre laboratoire.

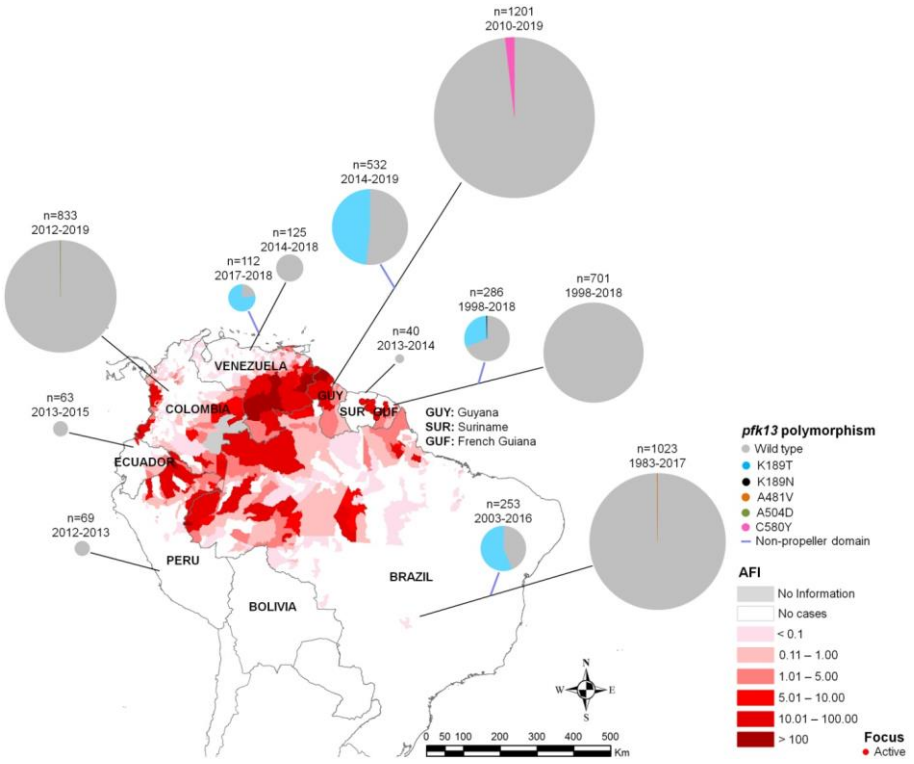


Figure 13. Distribution des mutations *pfk13* en Amazonie.
AFI : Incidence annuelle de *Plasmodium falciparum* (source PAHO 2017). Les diagrammes sont reliés à la capitale du pays. En Colombie, l'essenielle des analyses ont été faites sur les isolats de la côte Pacifique.

Par ailleurs, une analyse du risque de dispersion des mutants à partir de la Région 1 du Guyana a été effectuée sur la base des mouvements de populations humaines estimés à l'aide du nombre de cas importés entre les différentes régions d'Amazonie. Ainsi, le risque de dispersion à partir du foyer actuellement identifié

du Guyana se situerait essentiellement à l'intérieur du Guyana lui-même dans un premier temps (Figure 14A). Dans un second temps, cette mutation se disperserait aux états du Roraïma au Brésil et de Bolivar au Vénézuela voisins (Figure 14B). Un lien très étroit existe également entre les états du Maranhão, Pará et Amapá au Brésil et les pays du plateau des Guyanes car les orpailleurs brésiliens qui y travaillent sont très souvent originaires de ces états. Ainsi, la mutation pourrait également se disperser dans ces zones, Amapá et Pará essentiellement, puisque le Maranhão n'est pas une zone de transmission du paludisme.

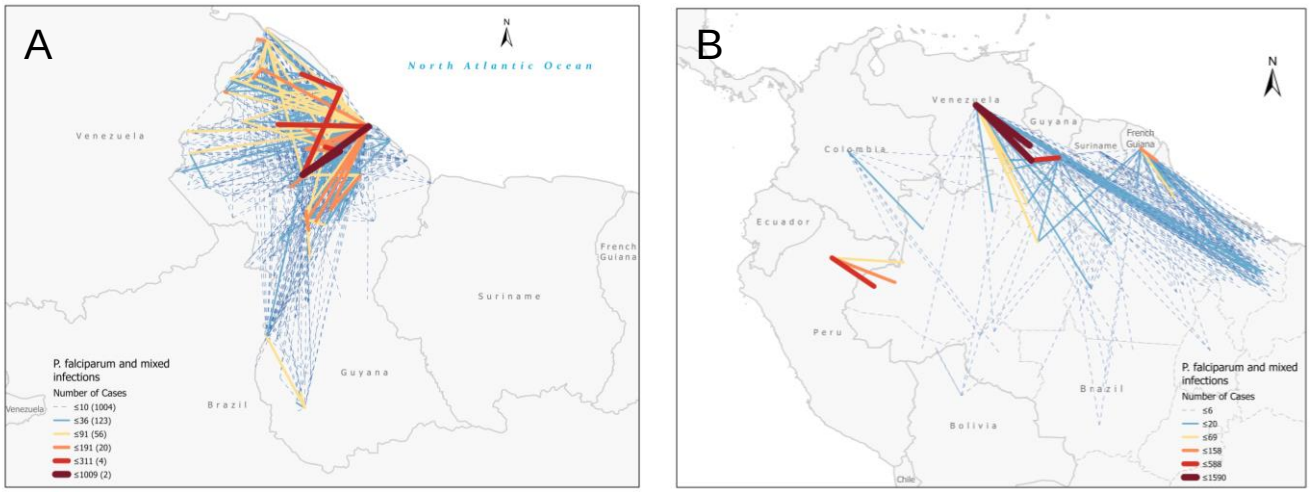


Figure 14. Mouvement des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*, entre le lieu potentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018.
Sources Paho, Ministère de la santé publique du Guyana.

Ce travail sur l'épidémiologie et la compréhension de la résistance aux artémisinines en Amazonie a permis de démontrer : i) que la mutation C580Y dans le gène *pfk13* a d'ores et déjà été sélectionnée au Guyana indépendamment des sélections asiatiques, ii) qu'elle est effectivement responsable d'un phénotype de résistance chez les parasites amazoniens, iii) qu'elle se transmet actuellement sous la forme d'un clone. Enfin, sa présence semble aujourd'hui limitée à ce pays dans la région est amazonienne. Cependant l'échantillonnage analysé est très faible comparé aux nombres de cas recensés au Guyana et surtout au Vénézuela. Ainsi, on ne peut pas exclure une circulation ou même une origine autre qui n'a pas pu être identifiée faute d'analyse suffisante. Cette mutation circule donc plutôt à bas bruit et en six ans, ne s'est pas dispersée. L'impact de cette mutation sur la biologie et les capacités de multiplication des parasites pourrait expliquer ce constat. Par ailleurs, la luméfantrine semble conserver une efficacité importante. Bien qu'elle ne soit pas l'unique association utilisée sur le plateau des Guyanes, l'artéméther-luméfantrine reste la recommandation officielle. L'utilisation de cette association efficace permet probablement de limiter la propagation des mutants qui n'ont qu'un avantage sélectif limité et peuvent se transmettre dans des zones où cette association est peu utilisée au profit de monothérapies ou de la dihydroartémisinine/pipéraquine qui semble avoir perdu une grande part de son efficacité (cf p.47). Ainsi, l'histoire de l'émergence de la résistance aux antipaludiques se répète et à nouveau nous constatons deux sites d'émergence initiaux : l'Asie du Sud-Est et l'Amazonie. Ces deux sites semblent propices à l'émergence du fait de la faible prévalence de *P. falciparum* dans ces zones. Ainsi, les compétitions entre clones sont plus limitées, l'immunité des patients aussi. Etant moins immun, ils sont généralement plus symptomatiques et la pression médicamenteuse qui en découle plus importante. Historiquement sur le plateau des Guyanes, dès qu'un trait avantageux est sélectionné chez les parasites, ce dernier se propage rapidement à l'ensemble des parasites et se fixe au sein de la population. Dans le cas de la résistance aux artémisinines, cette expansion est probablement limitée par l'efficacité de la molécule partenaire.

2017-2020. L'ensemble des travaux sur ce thème ont été réalisés par une étudiante en Doctorat de sciences que je co-encadre avec le Pr Magalie Pierre-Demar du laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne.

Les perspectives autour de cet axe sont nombreuses. Concernant les artémisinines, nous chercherons à mieux comprendre l'émergence/sélection de la résistance en mettant en œuvre des pressions médicamenteuses par la dihydroartémisinine. La vitesse de sélection de la résistance et d'apparition des mutations *pfk13* chez les isolats de Guyane sera comparée à celle d'un isolat collecté au Cambodge. Ces travaux seront réalisés en collaboration avec l'équipe de la faculté de pharmacie de Toulouse qui applique les mêmes méthodes sur des isolats en provenance d'Afrique. Ceci devrait nous permettre à terme de comparer les dynamiques et les marqueurs génétiques impliqués en fonction de la provenance des parasites. Ces pressions seront séquentielles, avec toujours la même concentration d'antipaludique, de façon à mimer au maximum la pression exercée sur les parasites au cours des traitements médicamenteux. Les paramètres étudiés seront le délai avant retour à une parasitémie de 1% ou encore le taux de survie mesuré par RSA toutes les cinq pressions. Par ailleurs, lorsque les ressources le permettront, j'envisage d'évaluer la capacité de transmission *via* le moustique de souches isogéniques mutées, C580Y ou R539T en collaboration avec l'unité d'entomologie médicale de l'Institut qui maîtrise la production de génération F1 d'*Anophèles darlingi*.

Concernant les molécules partenaires, nous envisageons également dans les mois qui viennent de nous intéresser à la résistance à la luméfantrine en analysant finement les nombreuses données *in vitro* actuellement disponibles et en tentant d'identfier un marqueur moléculaire de résistance. A ce sujet, une postdoctorante devrait être recrutée à la fin de l'année 2020 pour initier ce travail.

De manière plus prospective, nous avons engagé un projet il y a plusieurs années, Amazomics, qui visait à caractériser l'évolution adaptative des parasites au fil des ans, en fonction des pressions qu'ils subissent et de l'épidémiologie du paludisme en Guyane. Ce projet a été financé par le Labex Ceba à travers le projet Amazomics. Il est conduit en collaboration avec l'Université d'Harvard. Plus de 200 génomes sont ainsi en cours d'analyse de façon à identifier les régions du génome sous sélection ou inversement, déselectionnées. L'objectif sera aussi de décrire la structure génétique de la population parasitaire, en Guyane mais également au Guyana et de les comparer. L'échantillonage au Guyana a été effectué dans un espace temps beaucoup plus court, une année *versus* 20 ans en Guyane. Nous espérons valoriser les premiers résultats fin 2020, début 2021, et ensuite se servir de cette base de données de génomes pour explorer de manière préliminaire de nouvelles questions de recherche (recherche de nouveaux marqueurs sur la base de phénotypes notamment).

ETUDE DE *PLASMODIUM VIVAX* EN GUYANE

En arrivant en Guyane pour poursuivre mes travaux de recherche sur le paludisme, je ne pouvais m'affranchir du contexte épidémiologique dans lequel j'évoluais. En vingt ans, le nombre de cas de paludisme a diminué d'un facteur 10 en Guyane (Figure 15) alors que dans le même temps, sa population humaine doublait. Le plateau des Guyanes est propice au développement du paludisme à *P. falciparum* notamment du fait de ses activités minières. Ainsi, en Amérique du Sud, c'est l'endroit où sa prévalence est la plus élevée. Cette espèce se transmet essentiellement en milieu isolé où l'accès au diagnostic et aux soins est limité. Ceci favorise l'utilisation anarchique des antipaludiques et la sélection de parasites résistants, d'où cet important volet de recherche (cf ci-dessus) que je dédié à la résistance aux antipaludiques, cœur de ma formation universitaire.

En 2005, une inversion des prévalences s'est produite et *P. vivax* est devenue l'espèce majoritairement présente en Guyane. Le traitement de ces accès palustres est le même depuis près de 50 ans, la chloroquine. Cette dernière est normalement associée à la primaquine pour éliminer les hypnozoïtes présents dans le foie. Les difficultés de prescription de cette molécule en Guyane limitent son utilisation et expliquent probablement en grande partie l'épidémiologie actuelle du paludisme avec une plus grande difficulté à limiter les reviviscences et donc le nombre de cas à *P. vivax*.

Source Cire Guyane.

Figure 15. Nombre de cas de paludisme recensés en Guyane entre 1998 et 2018.

La pression médicamenteuse exercée par la chloroquine depuis des dizaines d'années laisse craindre un début de sélection de parasites résistants tel que l'on peut le constater dans la région de Manaus au Brésil (de Santana Filho, Arcanjo et al. 2007, Marques, Costa et al. 2014). C'est dans ce contexte que j'ai conduit ou participé à plusieurs projets de recherche s'intéressant à *P. vivax* en Guyane et aux résistances médicamenteuses associées. Le premier volet visait à évaluer la pertinence d'une alternative thérapeutique telle que la sulfadoxine-pyriméthamine, le deuxième à évaluer l'efficacité thérapeutique de la chloroquine et le troisième, plus fondamental, à étudier la diversité génétique de cette population parasitaire.

Evaluation de la prévalence des mutations des gènes *pvdhfr* et *pvdhps* en Guyane

Porteur du projet : *D. Ménard – Institut Pasteur de Madagascar*
Financement : *Observatoire de la Résistance aux Antipaludiques (ORA)*

L'objectif de ce travail était d'évaluer, sur la base des marqueurs de résistance connus chez *P. falciparum*, le niveau de résistance de *P. vivax* à la sulfadoxine-pyriméthamine.

Pour ce faire, un génotypage des gènes orthologues de *falciparum* impliqués dans la résistance à cette association, *pvdhfr* codant pour la dihydrofolate réductase et *pvdhps* codant pour la dihydroptéroate synthase, a été réalisé chez 90 isolats de *P. vivax* collectés entre 2000 et 2005 en Guyane.

Tous les échantillons analysés présentaient des mutations sur les deux gènes avec une prévalence de plus de 90% pour les mutations S58R et S117N sur le gène *pvdhfr* et S382C et A383G sur le gène *pvdhps*. Une nouvelle mutation, S116G, a été retrouvée à une fréquence de 3,3%. Au total, six génotypes différents ont été observés avec une prédominance (59,3%) du quintuple mutant 58R/117N/173L-382C/383G. Aucune variation de prévalence entre les années n'a été retrouvée.

Ces résultats suggèraient qu'en Guyane, l'utilisation de cette association en thérapeutique en cas de résistance massive à la chloroquine n'est pas envisageable.

📖 **P4**. Barnadas C, **Musset L**, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, Rogier C, Bouchier C, Picot S, Ménard D. High prevalence and fixation of *Plasmodium vivax dhfr/dhps* mutations related to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*, **2009**. 81**:** 19-22. *IF n+2: 2.59. DOI: 10.4269/ajtmh.2009.81.19.*

Génotype *pvmdr1* et résistance de *Plasmodium vivax* à la chloroquine en Guyane

Porteur du projet : *E. Legrand*
Financement : *Santé Publique France*

Cette étude avait pour objectif de déterminer la variabilité génétique et le nombre de copies du gène *pvmdr1*, impliqué dans la résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* et pour lequel on supposait une implication chez *P. vivax.* Ainsi, 480 isolats collectés en Guyane entre 1997 et 2013 ont été analysés.

Les résultats ont identifié quatre allèles circulants en Guyane. L'un d'entre eux incluait les mutations Y976F et F1076L potentiellement impliquées dans la résistance de *P. vivax* à la chloroquine en Asie notamment. Ce dernier était présent chez 1% (5/420) des isolats analysés. L'analyse temporelle n'a pas montré de différence significative de la proportion des différents allèles dans le temps (p>0,05).

Le nombre de copies du gène *pvmdr1* a été déterminé pour 471 isolats. Le nombre de copies variait de 1 à 8. 68,6% des isolats présentaient une copie unique du gène et 31,4 % des isolats au moins deux copies. L'analyse temporelle avait cette fois montrée une diminution des isolats multicopies au cours du temps avec un pourcentage passant de 71,3% pour la période 1997-2004 à 12,6% % pour la période 2009-2013.

Les résultats de cette étude ont montré qu'un pourcent des isolats circulants en Guyane étaient potentiellement résistants à la chloroquine sur la base de leur génotype, davantage sur la base de l'amplification du gène *pvmdr1*. Cependant, nous ne disposions pas de données phénotypiques pour confirmer ce lien génotype/phénotype de résistance à la chloroquine.

📖 **P31**. Faway E, **Musset L**, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S, Legrand E. *Plasmodium vivax* multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malar J*. **2016**. 15: 540. *IF n+2: 2.85. DOI: 10.1186/s12936-016-1595-9.*

2013. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 que j'ai co-encadrée avec E. Legrand.

Efficacité thérapeutique de la chloroquine de *Plasmodium vivax* en Guyane entre 2009 et 2015

Porteurs du projet : *L. Musset – F. Djossou Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'Hôpital de Cayenne*
Financement : *Santé Publique France*

En Amérique du Sud, la résistance à la chloroquine de *P. vivax* a été décrite à Manaus au Brésil, épicentre de la résistance dans la région amazonienne, à Oiapoque et en Bolivie. L'objectif de cette étude était d'amener de nouvelles données sur la résistance à *P. vivax* en Guyane en associant une évaluation rétrospective de l'efficacité thérapeutique et une analyse des parasitémies récurrentes de patients revenant en consultation avec de la fièvre.

Les dossiers des patients présentant une infection *à P. vivax* confirmée par microscopie et une température supérieure à 37,5°C à l'Hôpital de Cayenne ont ainsi été analysés entre mars 2009 et octobre 2015. Le suivi et la réponse thérapeutique ont été réalisés selon le protocole de l'OMS. La résistance parasitaire a été confirmée par un dosage plasmatique de la concentration en chloroquine présente chez le patient et la caractérisation des marqueurs microsatellites des parasites présent le jour de l'échec. Enfin, le gène *pvmdr1* (séquence et nombre de copies du gène) a été analysé chez les isolats résistants.

Après 28 jours de suivi, 164 patients ont présenté une réponse clinique et parasitologique adéquate. Huit cas d'échec thérapeutique ont été identifiés (5%, n=8/172), tous après J14. L'efficacité thérapeutique de la chloroquine a été évaluée à 95% IC 91,7-98,3 (n=164/172). Au sein de ces huit échecs, cinq ont pu être caractérisés : deux cas de résistance (1,2% ; 95% CI 0-2,8 ; n=2/172) et trois cas avec une concentration sub-thérapeutique en chloroquine suggérant un défaut d'absorption ou d'observance. Aucune mutation n'a été identifiée dans le gène *pvmdr1* des parasites résistants, pas plus qu'une amplification génique.

♦ La résistance de *P. vivax* à la chloroquine en Guyane existe mais son niveau ne nécessite aucun changement des recommandations thérapeutiques. Cependant, il est important de prescrire davantage de primaquine pour limiter au maximum la transmission de *P. vivax* et ainsi la diffusion d'éventuels parasites résistants. Le génotype *pvmdr1* n'étant pas informatif, l'identification d'un marqueur moléculaire de résistance de *P. vivax* à la chloroquine reste une priorité pour surveiller plus facilement cette résistance.

📖 **P40.** **Musset L**, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, Volney B, Walter G, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. Emergence of *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2019**. 63(11). *IF 2018: 4.72. DOI: 10.1128/AAC.02116-18*.

💬 **2015-2016.** Ce travail a été réalisé avec l'implication d'un interne en DES de biologie médicale. J'ai également été pour ce travail sa directrice de thèse d'exercice de médecine.

Une étude du même type à laquelle j'ai collaboré a été conduite à Oiapoque, ville brésilienne située en face de St Georges de l'Oyapock, où 1% d'isolats résistants ont été identifiés sans lien avec des mutations au sein du gène *pvdmdr1*.

📖 **P22.** Gomes MS, Vieira JL, Machado RL, Nacher M, Stefani A, **Musset L**, Legrand E, Menezes RA, Júnior AA, Sousa AP, Couto VS, Couto ÁA. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J*. **2015**. 14: 402. *IF n+2: 2.85. DOI: 10.1186/s12936-015-0925-7*.

Etude de la diversité génétique de *P. vivax* en Guyane

Porteurs du projet : *L. Musset – B. de Thoisy, Laboratoire Interactions Virus/Hôte, IP Guyane, Cayenne, France.*
Collaborations : *S. Briolant, H. Bogreau, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France.*
D. Neafsey, Broad Institute, Cambridge, USA
Financement : *Santé Publique France*

Comprendre la structure génétique d'une population parasitaire est essentielle pour comprendre la dynamique de la transmission, sa géographie mais également pour prédire la rapidité de propagation d'un phénotype d'intérêt (parasites résistants par exemple).

En analysant et comparant un panel de 15 marqueurs microsatellites (MS) et un panel de 42 mutations ponctuelles (SNP) de 223 isolats de *P. vivax* collectés entre 2006 et 2010 dans 18 localités de Guyane, la multiplicité des infections, la dynamique de la population et son évolution ont été étudiées. La variation

génétique a été comparée d'une région à l'autre, d'une année à l'autre et selon la saisonnalité de la transmission du paludisme.

Les marqueurs MS et SNP étaient suffisamment informatifs et polymorphes pour caractériser la génétique de la population. Les MS étaient généralement plus polymorphes que les SNP. L'analyse des résultats obtenus sur le même groupe d'échantillons a permis de confirmer que les MS évoluent plus vite que les SNP et qu'ils sont plus performants pour analyser les évènements récents liés à l'évolution d'une population parasitaire.

Les MS ont permis d'identifier 60,3% d'infections polyclonales en Guyane au cours de cette période. Cet important niveau de polyclonalité avait déjà été décrit chez *P. vivax* dans la région (Orjuela-Sanchez, Brandi et al. 2013). Cette polyclonalité est plus importante que pour *P. falciparum* (Barry, Waltmann et al. 2015) notamment du fait d'importants brassages génétiques des parasites favorisés par les reviviscences. Ils ont également permis de mettre en évidence des expansions clonales ponctuelles à l'origine d'épidémies dans une région donnée telle que celle observée en 2006 à St Georges de l'Oyapock.

A une échelle de temps plus ancienne, l'analyse des marqueurs, MS ou SNP, montre une population homogène probablement issue d'une introduction unique. Cette homogénéité est là encore probablement liée aux importantes migrations humaines au sein du plateau des Guyanes qui participent à un brassage et une homogénisation génétique de la population parasitaire (Figure 16).

Associés aux importants mouvements de la population humaine guyanaise, ces résultats laissent présager une diffusion rapide d'un génotype d'intérêt après sa sélection.

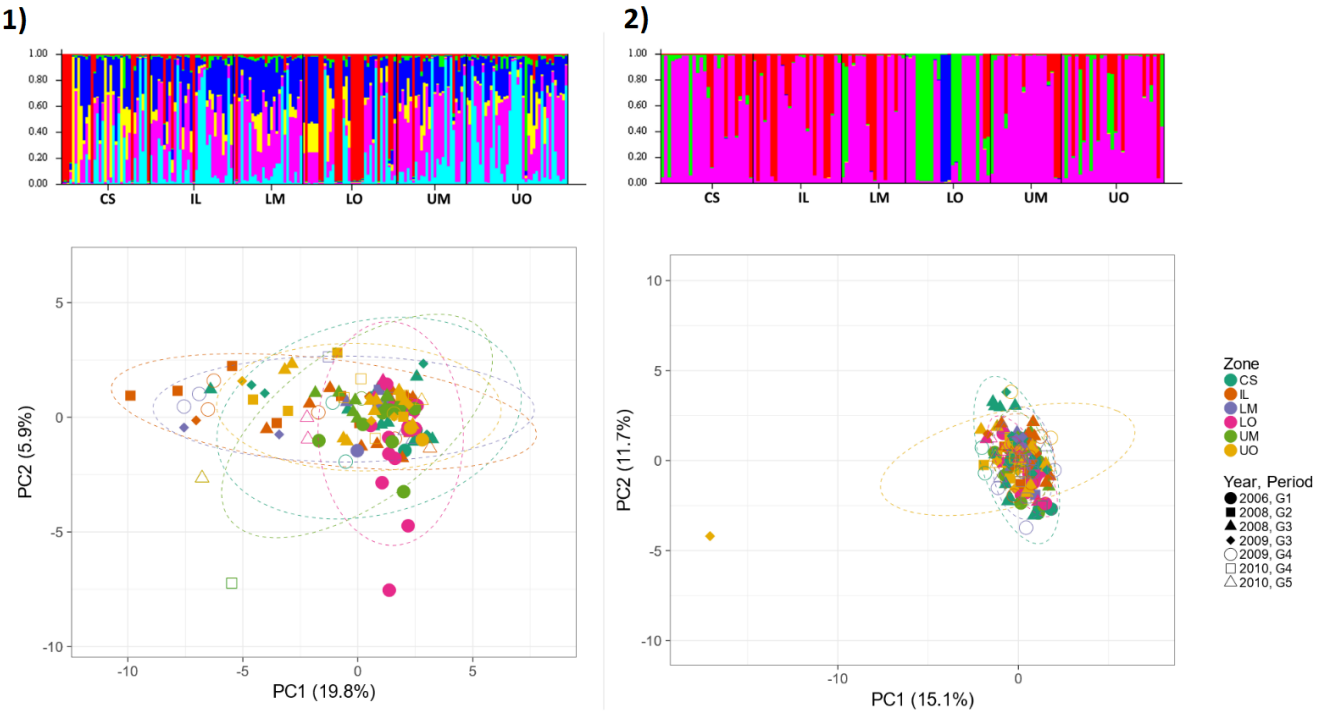


Figure 16. Analyses bayésienne et en composante principale de la diversité génétique de *P. vivax* en Guyane, 2006-2010.

1) analyse de 15 marqueurs microsatellitaires et 2), de 42 mutations ponctuelles de 142 isolats. CS : région côtière, IL : intérieur, LM : bas Maroni, LO : bas Oyapock, UM : haut Maroni, UO : haut Oyapock, G1 à G5 : périodes épidémiologique allant de avril à mars l'année suivante.

📖 **P ?**. Salmier S, Bogreau B, Baniecki ML, Ha Nguyen KY, Briolant S, Legrand E, de Thoisy B, Neafsey D, **Musset L**. Inputs from microsatellite and SNP markers to characterize a highly polymorphic but undifferentiated Plasmodium vivax population in French Guiana. En préparation.

Avant la publication du jeu de données dans son ensemble, une partie des résultats de barcoding a été publiée en collaboration avec nos partenaires d'Harvard :

📖 **P18**. Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, **Musset L**, Legrand E, Faust A, Baniecki ML, Ndiaye D, Daniels RF, Hartl DL, Sabeti PC, Wirth DF, Volkman SK, Neafsey DE. COIL: a methodology for evaluating malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*, **2015.** 14: 4. *IF n+2: 2.85. DOI: 10.1186/1475-2875-14-4.*

📖 **P17**. Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, Hamilton E, Ferreira MU, Karunaweera ND, Serre D, Zimmerman PA, Sa JM, Wellems TE, **Musset L**, Legrand E, Melnikov A, Neafsey DE, Volkman SK, Wirth DF, Sabeti PC. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl Trop Dis,* **2015**. 9:e0003539. *IF n+2: 4.37. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003539.*

💬 **2010-2020**. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 qui est ensuite revenue au cours d'un post-doctorat pour finaliser l'analyse de ces résultats.

UNE RECHERCHE OPERATIONNELLE AU SERVICE DU CONTROLE DU PALUDISME

Pour lutter efficacement contre le paludisme, il est nécessaire d'avoir des traitements efficaces mais également des outils de diagnostic performants. Au-delà de cela, il faut savoir où se trouve les poches de transmission, qui elles concernent, et pourquoi. Enfin, pour atteindre l'élimination de la pathologie dans une zone, les personnes qui y habitent et y sont exposées doivent être informées du risque qu'ils encourent et des attitudes à adopter pour mieux se protéger.
C'est autour de ces aspects, diagnostic, caractérisation des zones de transmission et éducation de la population, que j'ai développé, depuis 2010, un certain nombre de projets de recherche opérationnelle.

Performances des méthodes de diagnostic utilisées dans le cadre de la prise en charge du paludisme

Depuis 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de confirmer rapidement toute suspicion de cas de paludisme avant de délivrer un traitement antipaludique adapté en procédant à un diagnostic de certitude basé sur la recherche des plasmodies par microscopie ou test de diagnostic rapide (TDR) avant d'administrer un traitement antipaludique adapté. Cette recommandation a conduit à un essor des TDR qui sont devenus des outils de diagnostic de choix dans les zones reculées aux infrastructures limitées. Leur déploiement a ainsi permis d'accélérer et de faciliter la prise en charge des patients atteints de paludisme. Par voie de conséquence, les traitements présomptifs ont diminué et la pression médicamenteuse aussi.

Performances du test rapide Pf/Pan SD Bioline® et du test en place, OptiMAL-IT®, pour le diagnostic du paludisme en Guyane, 2010-2011.

Porteurs du projet :	*L. Musset*
Collaborations :	*B. Carme, D. Blanchet, Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne,* *F. Berger, Unité d'épidémiologie, Institut Pasteur de la Guyane.*
Financement :	*Santé Publique France*

Au moment où l'OMS déconseillait l'utilisation des tests recherchant la protéine $PfHRP_2$ en Amérique du Sud du fait de la forte prévalence de parasites délétés au niveau de ce gène, les CDPS de Guyane souhaitaient délaisser l'OptiMAL-IT®, test détectant la protéine pLDH, au profit d'un test $PfHRP_2$, le SD Malaria Ag P.f/Pan®. Leurs motivations étaient le coût mais surtout une meilleure sensibilité des tests $PfHRP_2$ pour détecter *P. falciparum*.

Ainsi, l'objectif de notre étude a été d'évaluer les performances de ces deux tests par rapport à la méthode de référence, l'examen microscopique, réalisé dans les conditions de routine, au centre de santé de Camopi et au laboratoire de parasitologie de l'Hôpital de Cayenne.

Entre janvier 2010 et août 2011, 1179 suspicions de paludisme ont été incluses dans l'étude. Pour le diagnostic de *P. falciparum*, le test le SD Malaria Ag P.f/Pan® présentait une meilleure sensibilité que l'OptiMAL-IT® (92,2% *vs* 83,7%, p=0,04) et meilleure spécificité (98,6% *vs* 92,4%, p<0,001), de même pour la sensibilité liée au diagnostic de *P. vivax*, 82,6% *vs* 55,6% (p<0,001). Par contre, aucune différence significative n'était observée concernant la spécificité.

Les discordances étaient plus fréquemment observées entre la microscopie et les TDR au centre de santé de Camopi (p<0,001). Ces discordances ont été expliquées par l'analyse des prélèvements par PCR. Un grand nombre de faux positifs ont été diagnostiqués par microscopie du fait du manque de formation régulière des lecteurs.

Enfin, beaucoup d'échantillons délétés au niveau du gène *pfhrp2* ayant été rapportés en Amérique du Sud, nous avons analysé l'exon 2 de ce gène par séquençage pour 41 échantillons. Aucune délétion n'a pu être observée et l'allèle majoritaire de $PfHRP_2$ circulant en Guyane a pu être décrit.

Le TDR SD Malaria Ag P.f/Pan® était donc performant et adapté au diagnostic du paludisme en Guyane. Il a ainsi été déployé et l'est toujours actuellement dans les Centres Délocalisés de Prévention et de Soins.

📖 **P12**. Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, Donato D, Legrand E, Carme B , **Musset L**. High performances of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *PLOS One*, **2013**. 8: epub. *IF n+2: 4.41. DOI: 10.1371/journal.pone.0074269*.

💬 **2011**. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une étudiante en master 2 de santé publique que j'ai encadrée et d'un interne en biologie médical encadré au laboratoire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne.

Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes

Porteur du projet : *L. Musset*
Collaborations : *H. Cox - Ministère de la santé publique du Guyana*
M. Magris, Vénézuela
Financement : *PAHO, Santé publique France*

🔥 Les tests rapides détectent trois types de protéines : la lactate déshydrogénase (LDH), l'aldolase ou encore la protéine 2 riche en histidine (Pf-HRP2). Des parasites délétés pour le gène *pfhrp2*, qui code cette protéine, ont été décrits en Amazonie (Gamboa, Ho et al. 2010). Dans de telles situations, le risque est d'étiqueter à tort un accès à *P. falciparum* comme un accès à *P. vivax* et de le traiter par chloroquine alors que sur le plateau des Guyanes, 20 à 30% des parasites sont chloroquino-résistants. En raison des flux migratoires et de la place des TDR dans cette région, une surveillance accrue de ces délétions était donc nécessaire. Par ailleurs, les dernières données disponibles pour la Guyane et le Guyana dataient de 2010, aucune donnée pour le Vénézuela.

Ainsi, des isolats collectés entre 2015 et 2018 en Guyane, au Guyana et au Vénézuela ont été étudiés selon les recommandations de l'OMS afin d'estimer la prévalence des délétions au niveau des gènes *pfhrp2/3*. Huit PCR analysant les deux parties, jonction exon 1-2 et exon 2, des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* et leurs gènes adjacents ont ainsi été utilisées. Le protocole d'étude comprenait également une PCR en temps réel comme méthode semi-quantitative permettant d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN des isolats étudiés afin de sélectionner les échantillons analysables et de limiter la surestimation des parasites délétés par simple fait que l'ADN était altéré ou en trop faible quantité. Un algorithme d'étude a également été mis en place intégrant la nécessité de limiter la consommation d'ADN. En effet, cette quantité est toujours limitée et la caractérisation des délétions requiert de nombreuses analyses consommatrices d'ADN. Aussi, seules des PCR nichées ont été utilisées pour augmenter la sensibilité sachant que les analyses se font généralement sur de l'ADN extrait de petites quantités de sang capillaire collecté sur papier buvard.

Au total, 633 isolats ont été étudiés. Au Vénézuela (n=105), 1,9% IC_{95} [0,0 – 4,6] des parasites présentaient une délétion au niveau de *pfhrp2* et 46,6% IC_{95} [37,0 – 56,2] au niveau du gène *pfhrp3* (Figure 17). Au Guyana (n=298) et en Guyane (n=230), aucun parasite délété pour le gène *pfhrp2* n'a été mis en évidence et respectivement 2,5% IC_{95} [0,7 – 4,3] et 0,5% IC_{95} [0,0 – 1,5] pour le gène *pfhrp3*.

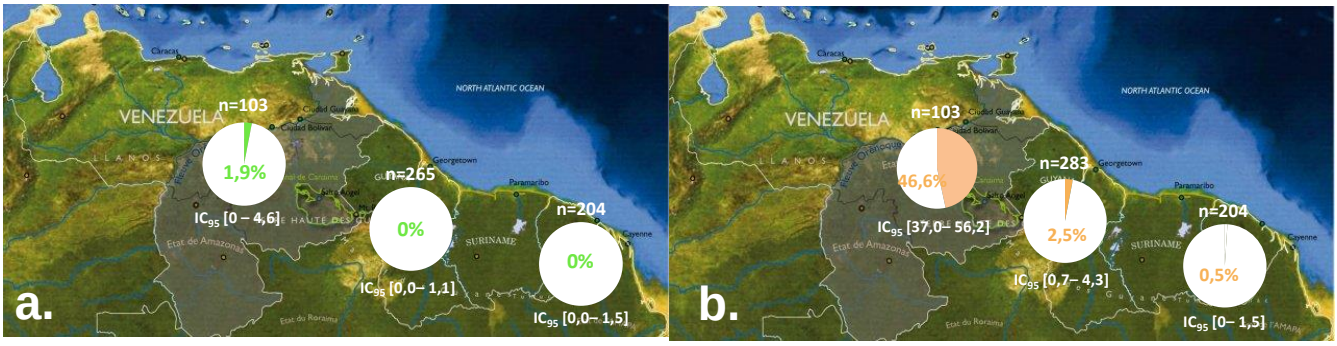


Figure 17. Prévalence des délétions du gène *pfhrp2* et *pfhrp3* sur le plateau des Guyanes, 2014-2018.
a) *pfhrp2*, b) *pfhrp3*.

Les délétions *pfhrp2* sont généralement totales et incluent une délétion du gène en aval MAL7P1.230. Les délétions *pfhrp3* sont aussi totales et plus larges en incluant aussi les deux gènes adjacents, l'amont (MAL13P1.475) et l'aval (MAL13P1.485).

Ces données mettent pour la première fois en évidence des isolats délétés pour le gène *pfhrp2* au Vénézuela et confirme leur absence en Guyane et au Guyana. La surveillance reste donc de mise dans ce pays mais les TDR basés sur Pf-HRP2 restent une bonne alternative diagnostique.

Les résultats au Vénézuela restent cependant à confirmer sur un échantillonnage plus important incluant au minimum 350 isolats si on se base sur une prévalence moyenne de délétion de 3%. Cette confirmation devrait avoir lieu courant 2021 en même temps que la valorisation de ces résultats.

2016-2017. Ce travail a été réalisé avec l'implication d'une interne en DES de biologie médicale. J'ai également été sa directrice de thèse d'exercice de médecine.

Intérêt du TDR SD Bioline® Pf/Pv pour détecter les infections mixtes en Guyane

Porteur du projet : *L. Musset*
Financement : *ARS Guyane*

Dans les centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS) de Guyane, le diagnostic du paludisme repose sur les tests rapides. Le TDR SD Bioline® Pf/Pan utilisé permet de différentier *P. falciparum* mais pas *P. vivax*. Ainsi, les infections mixtes ne sont pas identifiées. Cet élément limite la prise en charge des patients car on ne leur prescrit pas de primaquine. Or, compte tenu de la prévalence de *P. falciparum* et *P. vivax*, les infections mixtes ont pu représenter jusqu'à 20% des infections dans certaines régions situées le long de l'Oyapock.

En 2018, le laboratoire a évalué l'intérêt d'utiliser un test de diagnostic rapide permettant de distinguer les infections mixtes *P. falciparum*/*P. vivax* des infections à *P. falciparum*. Le TDR SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisé a été comparé au TDR SD Bioline® Pf/Pv au regard de la microscopie corrigée par PCR en temps réel.

Sur les 91 infections mixtes détectées par microscopie, 70 ont été confirmées par PCR. Les autres étaient des monoinfections. En premier lieu, ces résultats montrent que les infections mixtes ont tendance à être surestimées par microscopie, notamment la présence de *P. falciparum*. La crainte du microscopiste de passer à côté de cette espèce potentiellement mortelle pourrait expliquer cela. Sur les 70 isolats mixtes, le TDR SD Bioline® Pf/Pv a permis de détecter une infection mixte dans 62,8% des cas. Les cas non détectés l'étaient essentiellement du fait de la faible parasitémie de l'espèce minoritaire.

Déployer ce type de test voudrait dire renoncer à l'identification des cas à *P. malariae* puisqu'il n'inclut pas de bande Pan spécifique de l'ensemble des espèces plasmodiales pouvant infecter l'Homme. *P. malariae* est aujourd'hui extrêmement rare en Guyane. Nous avons tout de même testé la capacité des tests SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisés à détecter cette espèce à partir de neuf isolats disponibles dans la collection du CNR. Il n'en a détecté aucun alors que les parasitémies étaient comprises entre 0,01 et 0,5%. En changeant de test, nous ne perdrons donc rien par rapport à la situation actuelle mais ceci prouve qu'actuellement, les cas à *P. malariae* sont mal diagnostiqués par les TDR au sein des CDPS. En cas de patient présentant des signes évocateurs et un TDR négatif, les médecins des CDPS ont la possibilité de remédier cette limitation par l'envoi d'un prélèvement pour examen microscopique et/ou PCR à Cayenne notamment. Les résultats sont alors rendus dans les 24h pour la microscopie et cinq jours pour la PCR.

Le changement de test au profit du SD Bioline® Pf/Pv devait être discuté en comité de suivi du plan paludisme. L'actualité et la surcharge de travail des différents services ont entraîné le report de cette discussion.

Perspectives en terme d'étude et développement d'outils diagnostic

Evaluation d'une méthode de dosage rapide de l'enzyme G6PD et génotype associé

Porteur du projet : *L. Musset*
Financement : *ARS Guyane*

En Guyane, le paludisme est endémique et deux espèces prédominent : *P. falciparum* et *P. vivax*. Le traitement contre le paludisme à *Plasmodium vivax* inclut : la nivaquine pendant 3 jours pour éliminer les parasites sanguins circulants, et la primaquine pendant 14 jours contre les parasites dormants dans le foie, les hypnozoïtes. La primaquine peut générer des anémies hémolytiques iatrogènes chez les patients souffrant de favisme, à savoir d'un déficit en enzyme Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase (G6PD). Cette hémolyse

peut être suffisamment sévère pour entraîner le décès du patient déficitaire. Ainsi, les recommandations de l'OMS et du HCSP indiquent qu'il faut réaliser un dosage quantitatif de l'activité de cette enzyme avant sa prescription.

Ce déficit est une maladie héréditaire récessive liée au chromosome X caractérisée par des taux plus ou moins bas d'activité enzymatique qui est fonction du génotype des patients mais pas uniquement car le phénotype dépend du niveau d'activation du chromosome X pour chaque cellule. A l'heure actuelle, l'obtention d'un dosage en G6PD en Guyane est long puisqu'il est fait en France continentale et que les conditions pré-analytiques sont assez exigeantes. Ce délai inclut : le dosage de la G6PD à distance de l'accès, l'obtention du résultat du dosage G6PD puis de l'ATU nominative qui libère la primaquine pour un patient donné. Ainsi, dans les zones de transmission de *P. vivax*, les patients font généralement un accès de reviviscence (autour de J28) avant de se voir prescrire la primaquine.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances d'un test quantitatif rapide de dosage de l'activité en G6PD par gramme d'hémoglobine, « STANDARD G6PD » (SD BIOSENSOR) pour la détection des patients déficitaires en comparaison avec la méthode enzymatique de référence. Les objectifs secondaires de cette étude seront la vérification de la méthode d'analyse selon les recommandations de la norme NF EN ISO 15189:2012 et l'évaluation du lien génotype/phénotype en fonction des variants du gène G6PD retrouvés.

Les sujets présentant un déficit sévère sont rares en Guyane (<0,3%). Si l'inclusion se faisait de manière prospective, sans identification préalable des sujets déficitaires, le nombre de sujets nécessaire à l'inclusion serait d'environ 6 000 personnes pour obtenir environ 50 sujets présentant un déficit sévère d'activité en G6PD.
Pour faciliter les inclusions, cette étude sera donc réalisée chez des personnes dont le statut en G6PD est connu. Les 150 sujets sont à inclure dans l'étude et se répartissent de la manière suivante :

- ✓ 50 sujets avec une activité déficiente de G6PD (< 3,6 U/g Hb, catégorie « déficitaires sévères »)
- ✓ 50 sujets avec une activité intermédiaire de G6PD (< 9,6 U/g Hb, catégorie « intermédiaires »)
- ✓ 50 sujets avec une activité normale de G6PD (≥ 9,6 U/g Hb, catégorie « normaux »)

Le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique du nord-est en mars 2020. Dès que la situation sanitaire le permettra, les inclusions débuteront. Par ailleurs, le génotype associé sera étudié de manière à établir ou invalider la possibilité de prédire un phénotype déficitaire à partir du génotype.

2019. En prévision de ce projet, une étudiante canadienne en 2ème année de licence a mis au point le génotypage d'une partie du gène G6PD durant ses quatre mois de stage. Elle a réussi à amplifier une grande partie du gène codant la G6PD qui est très long, plus de 15Kb. Reste à mettre au point l'analyse de l'exon 1 de ce gène.

2020. Au cours du dernier trimestre 2020, une étudiante en 5ème année de pharmacie a finalisé la mise au point du génotypage des premiers exons et aussi développé une méthode de génotypage à partir de l'analyse de l'ADN complémentaire.

Méthode de détection des porteurs de gamétocytes par PCR en temps réel

Porteur du projet : *L. Musset*
Collaborationt : *T. Bousema*
Financement : *SPF*

De part ses missions de santé publique, le laboratoire intervient en tant qu'expert de la question du paludisme dans des dossiers de patients dont le diagnostic du paludisme est délicat, en microscopie ou par les tests rapides. Dans le cadre de la lutte contre cette pathologie et son élimination, il réalise également des PCR de diagnostic de manière à détecter les porteurs asymptomatiques susceptibles de transmettre le paludisme dans une zone. Pour étoffer sa palette de méthodes, nous envisageons de développer une méthode de détection des porteurs de gamétocytes que cela soit pour *P. falciparum* ou pour *P. vivax*. Ce développement se fera en collaboration avec l'équipe de Teun Bousema, de Radboud University Medical Centre aux Pays Bas specialiste de la transmisison du paludisme et de la biologie des gamétocytes.

Caractérisation des zones de transmission guyanaises et actions

Avec la diminution du nombre de cas depuis plusieurs années, les poches résiduelles de transmission s'amenuisent et il est fondamental, dans un objectif d'élimination, de les caractériser afin de mieux les cibler. Entre 2007 et 2014, alors que j'étais responsable adjointe du laboratoire, le CNR participait à la caractérisation des foyers épidémiques tels que celui de Saül investigué en 2009 et qui sera évoqué plus bas. Depuis 2015, j'ai inclus dans la stratégie de recherche du laboratoire un volet dédié aux zones de transmission. En effet, les connaître c'est pouvoir apporter des données chiffrées et des éléments factuels aux autorités de santé pour mieux les cibler même si elles concernent des populations sensibles. Je pense notamment ici à la question de la transmission du paludisme en zones orpaillées qui est une question très délicate en Guyane puisqu'elle touche des zones où des personnes ne sont pas supposées être sur le territoire, travaillent sans autorisation et où la France engage d'importants moyens pour limiter voire éliminer ces activités. Comment agir dans de telles zones, très éloignées, dispersées, qui sont supposées ne pas exister lorsqu'on est décideur de santé publique et que par ailleurs les moyens sont déjà très limités pour délivrer du soin en zone dite « normale » ? Rajouter à cela les réactions vives des populations locales qui adhèrent peu aux soins prodigués aux populations clandestines malgré le risque infectieux qui en découle. Il y a donc eu pendant plusieurs années un certain déni de la problématique du paludisme et de l'orpaillage. Le travail de longue haleine que j'ai pu mener en collaboration avec mes collègues travaillant sur cette même thématique avait pour objectif de pousser cette question tout en essayant de comprendre les problématiques de chacun et de trouver un consensus acceptable pour tous. Ainsi, après 10 ans d'engagement dans cette voie, je pense que l'on a passé avec succès plusieurs étapes : i) prouver et faire accepter l'idée que orpaillage et paludisme sont intimement liés sur le plateau des Guyanes, ii) intégrer ces zones et ces populations dans les stratégies de lutte, et enfin, iii) évaluer des méthodes innovantes de prise en charge de ces populations permettant de passer au-delà des nombreuses limitations, réglementaires, financières et politiques dans l'objectif de diminuer la transmission et protéger le plus longtemps possible les molécules efficaces.

Au-delà des zones orpaillées, le paludisme se transmet encore largement le long de l'Oyapock et dans quelques villages du Haut Maroni. Saint Georges de l'Oyapock est une commune où le nombre de cas dans certains quartiers est particulièrement important. Pour le différencier du paludisme en zone orpaillée, il est localement denommé « paludisme autochtone ». Aussi, en collaboration avec l'Hôpital de Cayenne et ses Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, nous avons monté un projet de recherche opérationnel visant à tester une approche de dépistage actif suivi d'un traitement systématique des porteurs.

Toutes ces actions de terrain n'ont été menées et possibles que grâce à une approche multidisciplinaire où plusieurs acteurs aux compétences complémentaires ont été impliqués. Mes deux partenaires majeurs sur ce type d'actions sont le Centre d'Investigation Clinique (CIC) et l'Hôpital de Cayenne.

Paludisme et orpaillage en Guyane

Les premières constatations au cours de l'épidémie de Saül, novembre 2008

Investigation : *Cire Antilles-Guyane*
CNR du paludisme
Direction de la Démoustication et de l'Action Sociale, Département de la Guyane
Unités d'Entomologie Médicale et d'Epidémiologie de l'Institut Pasteur de la Guyane

A la suite d'une augmentation significative, fin 2008, du nombre de cas recensés à Saül, un village du centre de la Guyane, une investigation entomo-épidémiologique a été initiée en janvier 2019. Son objectif était de décrire l'épidémie et d'identifier les facteurs de risques environnementaux et comportementaux.

Du 14 au 16 janvier 2009, une enquête de cohorte rétrospective portant sur l'ensemble des habitants a été menée. Quatre binômes d'investigateurs ont travaillé sur un total de neuf secteurs de résidence définis à partir d'une photographie aérienne. Des informations sur les accès survenus entre le 30 juin et le 31 décembre 2008 (dates, signes cliniques, espèce parasitaire…) ont été renseignés pour chacun des habitants. Les sujets ont été interrogés sur les moyens de prévention individuels et collectifs mis en œuvre. Enfin, les lieux fréquentés en dehors du bourg de Saül durant la période d'étude ont été demandés. Soixante huit habitants ont été interrogés sur un total estimé à 74. L'âge médian était de 39 ans (extrêmes : 1-83), le sex-ratio de 1,3. Au total, 48 sujets ont présenté entre un et cinq accès palustres durant les 19 semaines de la période d'étude,

soit un taux de densité d'incidence de 7% personne/semaine (92 accès). *P. falciparum* représentait 59% des accès (54/92). L'analyse des données n'a pas permis d'identifier de lieu à risque, dans le bourg de Saül ou dans ses environs. Cependant, le poste de santé recevait de nombreux orpailleurs eux même impaludés pour consultation. Lors de leur séjour dans le bourg, ils ont ainsi pu initier une chaîne de transmission qui n'a ensuite pas tardé à toucher bon nombre des habitants du village.

L'étude de la chimiosensibilité des isolats provenant de Saül sur la même période n'a pas parmi d'identifier de résistance aux 11 molécules testées sur 14 isolats.

L'enquête entomologique, exploratoire puisqu'aucune information récente n'était disponible sur l'anophélisme dans la région de Saül, a reposé sur des captures sur Homme et des prospections larvaires dans le bourg et ses environs. La présence, dans le bourg, de formes adultes et larvaires d'*Anopheles darlingi* a été confirmée. Dans le bourg et les alentours du village, des larves d'anophèles d'autres espèces ont été collectées dans différents types de gîtes naturels et anthropiques.

📖 **P9**. Berger F, Flamand C, **Musset L**, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, Dusfour I, Legrand E, Ardillon V, Rabarison P, Grenier C, Girod R. Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saül, French Guiana, January-April 2009. *Am J Trop Med Hyg*, **2012**. 86: 591-597. *IF n+2: 2.70. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0582*.

📖 **P5**. Berger F, Girod R, Grenier C, Djossou F, Rosine J, Ardillon V, Ruello M, Sanquer MA, Besançon L, **Musset L**, Flamand C. Recrudescence de paludisme à Saül, Guyane, 2008. *BVS Antilles-Guyane*, **2009**. 11: 2-4.

ORPAL confirme une situation inquiétante mais hétérogène dans les zones orpaillées

Porteur de projet :	*M. Douine, CIC Guyane*
Collaborations :	*Ministère de la santé du Suriname*
	Association SWOS
Financements :	*FEDER*

💧 Pendant quelques années à la suite de cette investigation de Saül, le dialogue avec les autorités sanitaires était délicat sur ce sujet. Compte tenu des implications politiques, réglementaires et de l'impact que cela pouvait avoir auprès de la population locale, il était difficile pour eux de reconnaitre que paludisme et orpaillage (essentiellement clandestin en Guyane) étaient liés. Dans le même temps, nos partenaires surinamais s'impatientaient de plus en plus vis-à-vis de l'attentisme français et répètaient à qui voulait l'entendre qu'en Guyane les orpailleurs n'avaient pas accès aux soins et que la France ne faisait rien pour prendre en compte cette situation si ce n'était, d'exporter des cas sur leur territoire. L'expérience de tous les acteurs de santé de Guyane était pourtant claire, les patients atteints de paludisme revenaient pour beaucoup, voire pour tous, de zones orpaillées. Maintenant, aucune donnée chiffrée n'était disponible si ce n'est celles liées à l'épidémie de Saül en 2008. Aussi, en 2014, le service de santé des Armées, lui-même confronté à cette question via les militaires qui revenaient d'opérations Harpie très impaludés, décida de se rendre sur le site d'orpaillage Eau Claire pour une investigation entomo-épidémiologique. Ainsi, plus de 200 orpailleurs ont été prélevés et diagnostiqués. Une prévalence de 48,3% de porteurs de plasmodies y a été observée (📖 **P26**. Pommier de Santi et *al.*, 2016).

Dans le même temps, le projet ORPAL, porté par le CIC en collaboration avec notre CNR, a été financé par les fonds de développement régionaux, FEDER. Son objectif était d'évaluer la prévalence du portage asymptomatique de plasmodies sur les sites d'orpaillage de manière globale et non sur un site en particulier. Le deuxième objectif était de recueillir des données sur les connaissances/attitudes/pratiques des orpailleurs vis-à-vis du paludisme.

Pour ce faire, entre janvier et juin 2015, 421 personnes ont été incluses dans l'étude et recrutées sur les bases de repli, lieux de repos et d'approvisionnement des orpailleurs sur la rive surinamaise du fleuve Maroni. Etaient inclus, les orpailleurs travaillant en Guyane, majeurs et présents sur le site de repli depuis moins de 7 jours (période minimale d'incubation du paludisme). Un test de diagnostic rapide du paludisme était réalisé sur place et un traitement donné gratuitement s'il était positif. Un prélèvement sanguin était réalisé pour examen microscopique et PCR à Cayenne. Un questionnaire recueillait des données socio-démographiques, de mode de vie sur les sites d'orpaillage, et les connaissances, attitudes et pratiques des orpailleurs vis-à-vis du paludisme. Les autorisations éthiques et règlementaires ont été obtenues en France et au Suriname.

La moyenne d'âge des personnes incluses était de 37 ans [30-45], dont 70,6% d'hommes en grande majorité brésiliens de nationalité (93,8%). La prévalence de portage de *Plasmodium spp.* était de 22,3% en moyenne, dont 84,0% étaient asymptomatiques (absence de fièvre dans les 48h précédant l'inclusion).

Après regroupement en 10 zones des 68 sites d'orpaillage, la prévalence variait de 3,8% à 46,4% (Figure 18). La région la plus impaludée était située autour de Maripa Soula venant confirmer les chiffres obtenus au cours de la mission à Eaux Claires précédemment citée. L'hétérogénéité de la prévalence de portage entre les zones orpaillées était importante et venait confirmer ce qui était observé dans les CDPS situés non loin de ces zones. Certaines zones ne faisaient pas l'objet d'une transmission majeure bien qu'elles soient orpaillées.

Lors du dernier épisode de paludisme, 53,7% des personnes interrogées déclaraient s'être automédiquées, en raison de l'éloignement des structures de soin. Les traitements utilisés en automédication contenaient dans 90% des cas des dérivés de l'artémisinine essentiellement la spécialité Artecom® incluant DHA-pipéraquine-triméthoprime. L'observance déclarée était bonne dans 60% des cas. Après analyse multivariée, le fait d'être en Guyane lors de l'épisode de paludisme et d'être sur ce territoire depuis au moins 3 ans étaient associés à l'automédication (OR=27,8 IC_{95} [9,5 - 81,6] et OR=2, IC_{95} [1,1 - 3,5], respectivement).

L'automédication fréquente et incomplète avec des dérivés de l'artémisinine laissait craindre l'apparition de résistance à ces molécules. Cependant, l'analyse du gène en lien avec la résistance aux dérivés de l'artémisinine (*pfK13*) n'a pas permis de mettre en évidence de mutations sur les 31 échantillons analysables. Six isolats ont pu être phénotypés à l'aide du test RSA. Un isolat présentait un taux de survie de 2,7%, ce qui suggère une diminution de la sensibilité vis-à-vis de ces molécules sans mutation au niveau du gène *pfk13*.

- Les orpailleurs étaient donc effectivement bien impaludés, et à un niveau très important dans les zones d'exploitation situées entre Saül et Maripa Soula. Il s'agit là des zones où les personnes travaillent dans sur des sites très éloignées des centres de diagnostic et de soins. Aussi, dans ces zones, ces populations devraient faire l'objet d'actions de santé publique prioritaires.

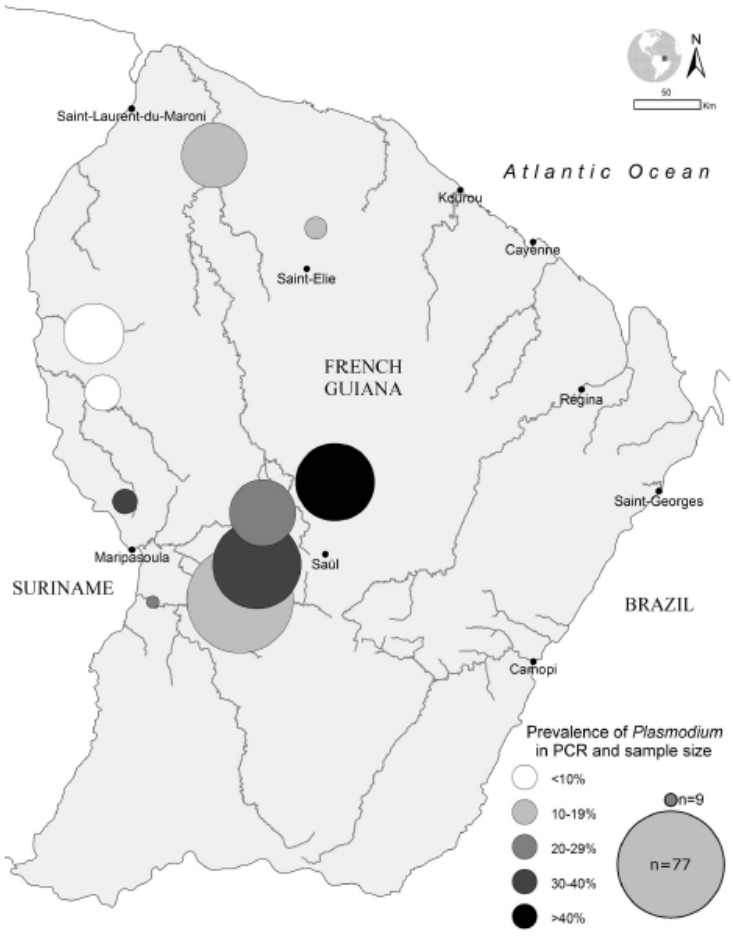


Figure 18. Prévalence du portage à *Plasmodium spp.* chez les orpailleurs travaillant en Guyane, 2015.

📖 **P27**. Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Pasuier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, Demar M, Nacher M. Prevalence of *Plasmodium spp*. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*, **2016**. 15: 315. *IF n+2: 2.85. DOI: 10.1186/s12936-016-1367-6.*

📖 **P36**. Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, Adenis A, Lazrek Y, Niemetsky F, Aucouturier AL, Demar M, **Musset L**, Nacher M. Illegal gold miners in French Guiana : a neglected population with poor health. *BMC Public Health*, **2017**. 18: 23. *DOI: 10.1186/s12889-017-4557-4.*

📖 **P37**. Douine M, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, **Musset L**. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in French Guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2018**. 73: 231-239. *DOI: 10.1093/jac/dkx343.*

📖. Douine M, **Musset L**, Corlin F, Pelleau S, Mutricy L, Adenis A, Mosnier E, Djossou F, Hiwat H, Demar M, Nacher M. Malaria and illegal gold mining in French Guiana: A major public health challenge. *Bull Epid Hebdo*, **2017**. 6: 102-109.

🐟 **2019**. Le dépistage des porteurs asymptomatiques par PCR a été effectué avec l'aide d'une étudiante en 1ère année de DUT génie biologique.

MALAKIT, une étude pilote sur une approche innovante d'autotest et autotraitement du paludisme

Porteur de projet :	*M. Douine, CIC Guyane*
Collaborations :	*Ministères de la santé du Brésil, du Suriname, de la France*
	Etat d'Amapa
	ARS Guyane
	Associations DPAC et SWOS
	Fiocruz
Financements :	*Interreg, ARS Guyane, Fond Mondial, Programmes nationaux, PAHO, CTG, AFD*

💧 Sur la base des chiffres obtenus lors des études ORPAL et Eaux-Claires, de nombreuses approches pour tenter de cibler cette population ont été discutées. Tout d'abord, envoyer des soignants sur les sites orpaillés. Impossible à bien des égards : le coût d'une telle approche, la difficulté d'envoyer suffisamment de monde en même temps pour espérer diminuer la transmission dans des zones dispersées et environnementalement hostiles et dont on ne connaît pas officiellement la localisation. Déployer en collaboration avec les orpailleurs, des agents de santé formés au diagnostic et au traitement du paludisme comme cela se fait au Suriname dans le cadre de leur programme de lutte « Looking for gold, finding malaria », et qui commence à être déployé au Guyana. Impossible en France car seuls les personnels de santé peuvent diagnostiquer et traiter.

Par ailleurs, comment « légitimer » certaines personnes sur des sites d'orpaillage qui peuvent être démantelés d'une minute à l'autre par les opérations Harpie ? Finalement, la solution acceptable à tout point de vue et qui selon nous méritait d'être évaluée, vise à distribuer des kits d'autodiagnostic et d'auto-traitement aux personnes vivant dans ces zones reculées et de les former à la réalisation de ces tests et la prise d'un traitement complet, en cas de positivité uniquement. La finalité de cette approche est double : i) limiter les traitements présomptifs et la prise aléatoire et non contrôlée d'antipaludiques et, ii) si la distribution atteint une couverture suffisante, diminuer le niveau de transmission dans ces zones.

C'est ainsi que l'étude internationale MALAKIT, innovante et ambitieuse a vu le jour. Nous avons créé un kit d'autodiagnostic et d'autotraitement du paludisme appelé « Malakit », qui a été remis aux orpailleurs après une formation à sa bonne utilisation d'environ une heure (Figure 19). Entre avril 2018 et décembre 2020, 4 259 kits ont été distribués au niveau des zones de replis situées côtés Suriname et Brésil soit 3 471 personnes incluses (Figure 19). Au cours de la distribution, une méthodologie scientifique rigoureuse a été mise en place avec un recueil de données de suivi au fil de l'eau et une étude transversale à la fin de la distribution, comparable à ORPAL afin de voir si les attitudes et les pratiques ont été modifiées par cette distribution.

Figure 19. Antonio do Brinco à la frontière entre le Suriname et la Guyane, lieu de distribution de Malakit.

L'ensemble des données descriptives et de connaissances attitudes et pratiques obtenues dans le cadre des études ORPAL (n=1 098) a permis de montrer un sexe-ratio à 3 et un âge moyen des orpailleurs de 38,8 ans [16-70]. Il a également été estimé que 5,2% des personnes présentent sur site d'orpaillage sont des enfants. Les personnes sont à 97% nées au Brésil et pour 54% d'entres elles dans l'état du Maranhão, 22% dans l'état du Pará et 11% dans l'Amapá. Plus de 96% des personnes interrogées ne possèdaient pas de couverture sociale française. Cela faisait en moyenne plus de 11 ans [4-16] qu'ils travaillaient dans l'orpaillage et en moyenne six mois sur un même site. Il semblerait que les orpailleurs se déplacent moins pour ceux qui ont été inclus côté Oyapock par rapport à ceux qui travaillent côté Maroni. Trois quart des personnes n'ont pas une activité qui impose une mobilité fréquente mais les orpailleurs quittent leur site environ tous les trois mois côté Maroni, six mois côté Brésil. La période de Noël est particulièrement propice aux mouvements. Ils pouvaient avoir travaillé au maximum dans 31 sites différents et ont besoin de plus d'une journée pour rejoindre leur site de travail respectivement pour 36,7% d'entres eux côté Maroni et 65,6% côté Oyapock. Plus de la moitié (55,6%) travaille en extraction alluvionnaire.

Le concept de Malakit a été bien accepté et les distributions présentaient une meilleure efficacité de contact avec le médiateur lorsqu'elles étaient actives, et que ces derniers allaient vers les personnes cibles. Il a été montré que le recours aux antipaludiques issus du marché noir a été diminué par 2 (OR=0,6, $IC_{95\%}$ [0,3-0,9]) suite à la distribution Malakit. Le recours aux traitements « officiels » (centres de soins ou Malakit) a augmenté d'autant (OR=1,8, $IC_{95\%}$ [1,1-3,0]). Cependant, pour un certain nombre, cela a aussi diminué le recours au système de soins au profit de Malakit. La réalisation de TDR a été analysée et 91% des personnes formées le réalisait correctement et l'ont effectué avant de prendre un traitement. L'observance n'était pas différente avant et après la distribution mais toujours meilleure lorsque le traitement était délivré par un centre de soins (92%) ou *via* Malakit (82%). Ainsi, 72,4% des personnes ont pris un traitement correct après un test TDR positif $IC_{95\%}$ [66,9-77,9]. En revanche, 25,5% $IC_{95\%}$ [19,4-31,7] des personnes ont tout de même pris un traitement malgré un TDR négatif. Le niveau de connaissance sur le paludisme a peu varié avant et après Malakit mais les personnes ont bien intégré qu'il faut faire le test avant de prendre le traitement (91,5% $IC_{95\%}$ [88,1-94,9]. Cependant, les informations relatives à la posologie et à la durée du traitement ont été plus faiblement assimilées, 61,6% $IC_{95\%}$ [55,7-67,6].

En 2015, ORPAL rapportait une prévalence moyenne du paludisme de 22,3% $IC_{95\%}$ [18,3-26,3] contre 5,3% $IC_{95\%}$ [3,0-7,5] observée fin 2019 au cours d'ORPAL post distribution qui incluait 380 orpailleurs sur le Maroni et 199 côté Oyapock. Ces résultats sont cependant à analyser avec précaution puisque sur la même période, la transmission du paludisme a globalement diminué partout. Une analyse est en cours pour évaluer l'impact direct de cette approche sur la transmission du paludisme en forêt. La proportion de *P. vivax* a augmentée entre les deux études (42% *vs* 75%), ce qui est le signe d'une meilleure prise en charge puisque *P. falciparum* a reculé. Les reviviscences à *P. vivax* sont probablement à l'origine de cette inversion puisque les traitements fournis dans le kit n'incluaient pas de primaquine à visée anti-hypnozoitaire. Cette approche a cependant quelques limites : 34% des kits ont été donnés ou vendus après inclusion mais à la suite de cela, 66,7% $IC_{95\%}$ [53,7-79,6] des personnes les ont tout de même correctement utilisés. Globalement, 64% des orpailleurs interrogés en fin de distribution avaient entendu parler de Malakit, y compris dans les sites les plus reculés, et

77% voyaient un intérêt à cette approche. Sur la base de ce résultat, le nombre global d'orpailleurs a été estimé à 11 600 personnes.

L'analyse des premiers résultats de MALAKIT et ORPAL post distribution est toute récente et la valorisation des résultats par des publications ne fait que commencer. La présentation de l'approche ainsi que de nombreuses revues sur le paludisme en zone orpaillée ont tout de même été publiée. De nombreuses présentations orales ont également été faites de manière à exliquer cette approche, certes innovante, mais qui peut être déroutante si on ne connait pas bien le contexte qui le sous-tend.

Le laboratoire a été partie prenante dans cette aventure d'amélioration de la prise en charge du paludisme en zone orpaillée. Pour avoir participé aux discussions autour de cette question depuis le début, ce projet est le fruit de nombreuses années de concertation, de persuasion des autorités pour obtenir l'adhésion de tous puis une confiance mutuelle (acteurs de santé, financeurs et autorités) tissée au fil du temps pour oser monter et mener à bien ce projet. Je pense que mon expertise de la question du paludisme et de son contexte « plateau des Guyanes » (📖 **R2**) avec les limites réglementaires et politiques en France a été importante pour aider à concevoir cette approche et tenter de trouver la solution la plus adaptée à cette population, et la tester. D'un point de vue biologique et scientifique, nous avons réalisé les PCR de diagnostic et analyser avec attention des discordances observées entre les TDR sur le terrain et les résultats de PCR. Ce projet a été une belle aventure humaine et a prouvé qu'avec de la volonté, de l'initiave et de la persévérance, il est possible de faire bouger les lignes en prenant, aux moments opportuns, des risques et de l'initiative.

📖 **P38**. Douine M, Sanna A, Galindo M, **Musset L**, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. Malakit: an innovative pilot project to self-diagnose and self-treat malaria among illegal gold miners in the Guiana Shield. *Malar J*, **2018**;17(1):158. *IF n+2: 2.71. DOI: 10.1186/s12936-018-2306-5*.

📖 **R3**. Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. *IF n-2: 0.92. DOI: 10.1007/s40475-020-00202-5*.

📖 **R5**. Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, **2020**;7(2):37-47. *IF n-2: 0.92. DOI: 10.1007/s40475-020-00202-5*.

Paludisme et transmission hors zones orpaillées ou paludisme dit autochtone

🔥 Au-delà de la transmission en zone orpaillée, le paludisme, surtout à *P. vivax,* touche également des populations locales vivant le long des fleuves frontières, le long de l'Oyapock et la zone du Haut Maroni. La transmission observée y est généralement saisonnière avec une recrudescence du nombre de cas observés entre septembre et janvier. Aussi, en partenariat étroit avec l'Hôpital de Cayenne, nous avons choisi en 2015 de caractériser la transmission du paludisme dans la région du bas Oyapock, sur la commune de Saint Georges de l'Oyapock.

Dépistage actif et traitement du paludisme à *P. vivax* en Guyane : faisabilité et acceptabilité ?

Porteur de projet : *E. Mosnier, infectiologue, Centres Dlocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne*
Financement : *ARS Guyane*

En 2015, nous avons réalisé notre première étude transversale en période inter-épidémique dans un quartier relativement éloigné (10 minutes de Pirogue) de Saint de Georges de l'Oyapock, Blondin. Au cours de cette étude préliminaire, 58 des 63 habitants du quartier ont été inclus. La moyenne d'âge était de 23,3 ans [2 mois - 72 ans] et le sexe-ratio homme/femme de 0,56. Soixante quatorze pour cent (n = 43/58) de la population d'étude déclaraient au moins un antécédent palustre au cours de leur vie, dont 12 % (n = 7/58) au cours de l'année précédente. Tous les tests de diagnostic rapide du paludisme étaient négatifs. Le diagnostic de paludisme par PCR avait permis d'identifier deux porteurs asymptomatiques : un enfant porteur de *P. vivax* et un adulte porteur de *P. falciparum*. Cela représentait une prévalence totale de 3,6% IC_{95} [0,00 – 8,14]. Ces deux patients ont été traités et n'ont pas développé d'accès palustre symptomatique dans les huit mois qui ont suivi.

Cette première étude nous a permis de mettre en évidence un très bon niveau de participation de la population et d'évaluer les ressources nécessaires à la mise en place d'une approche de dépistage plus large sur la commune. Pour rappel, cette commune est située à l'est de la Guyane, à la frontière avec le Brésil, à 188 km, environ 2h30 de route de Cayenne. Cette route, la nationale 2, est en service depuis 2008.

📖 **P35**. Mosnier E, Douine M, Epelboin L, Pelleau S, Pommier de Santi V, Dangel Y, Demar M, Mutricy R, Guarmit B, Nacher M, Brousse P, Davy D, Djossou F, **Musset L**. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *vivax* infection in the neighborhood of Blondin, Saint-Georges-de-l'Oyapock District, French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot*, **2017**;110(4):265-9. *DOI: 10.1007/s13149-017-0572-z*..

2019. Le dépistage des porteurs asymptomatiques par PCR a été effectué avec l'aide d'une étudiante en 1ère année de DUT génie biologique.

PALUSTOP : Prévalence du paludisme à St Georges de l'Oyapock (Axe 1 du projet Elimalar)

Coordinatrice ELIMALAR :	*L. Musset*
Coordinatrice PALUSTOP	*E. Mosnier, Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne*
Participants au projet :	*O. Moriceau, Y. Lazrek, E. Roux, M. Gaillet*
Collaborations :	*Association DAAC*
	IRD Espace-dev

Description succincte de l'étude

Suite à l'étude de Blondin, la bonne acceptabilité de la population nous a permis d'envisager un projet de plus grande envergure. Ainsi, au sein du projet ELIMALAR décrit en préambule de ce document (p.50), nous avons développé un axe dédié au dépistage actif du paludisme suivi d'un traitement ciblé de l'ensemble des porteurs de parasites. PALUSTOP, nom donné à ce projet, se voulait plus global et au-delà du dépistage et du traitement, incluait :

- une approche de santé communautaire visant à mieux comprendre les connaissances, attitudes et pratiques de la population vis-à-vis du paludisme,
- l'élaboration d'outils d'éducation à la question du paludisme adaptés aux communautés,
- une analyse des connaissances et usages relatifs à l'utilisation de plantes médicinales,
- une étude des vecteurs présents sur site.

Nous avons donc cherché à caractériser le réservoir parasitaire présent à Saint Georges de l'Oyapock en conduisant une enquête transversale avant-après entre octobre et décembre 2017 et 2018 auprès de 36% (n=1549/4355) des habitants de la commune. Les quartiers de St Georges présentant la plus forte incidence dans les deux ans auparavant ont été ciblés (Figure 20).

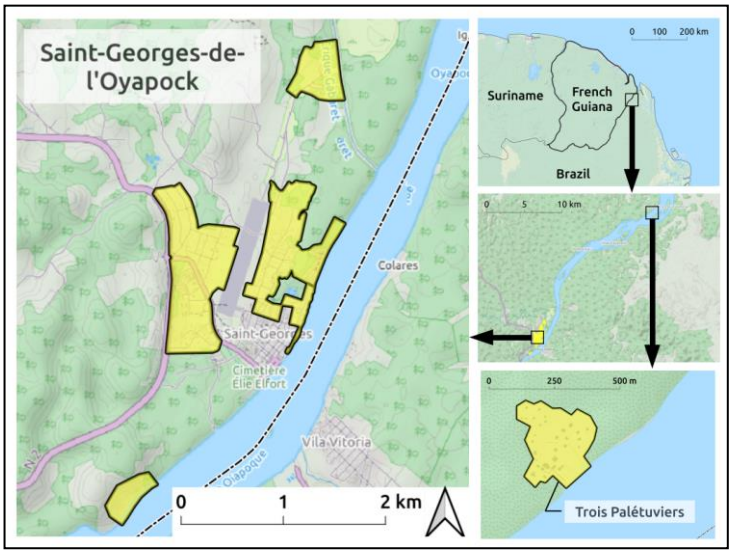


Figure 20. Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.

Ce dépistage a été effectué en 42 jours en déployant des postes avancés de prélèvement, au plus près de la population. Des tandems infirmier/médiateur en santé issus des communautés avaient pour mission de sensibiliser la population, de réaliser les enquêtes connaissances/attitudes/pratiques (CAP), soit environ 120 questions posées aux habitants, et les prélèvements. Lorsqu'une personne positive était identifiée, un traitement incluant de la primaquine à distance pour les porteuses de *P. vivax* était administré par un infectiologue. Le dosage en G6PD a été effectué pour l'ensemble de la population. Les résultats ont ensuite

été renseignés dans les dossiers patients du centre de santé afin de gagner du temps dans l'administration de primaquine lors d'un prochain accès palustre, même hors projet PALUSTOP. Les maisons ont également été géoréférencées. La démographie, les antécédents médicaux enregistrés et analysés par grappes géographiques (SaTScan). La prévalence de *Plasmodium spp*. a été mesurée par TDR et PCR et une analyse multivariée des facteurs de risque conduite.

Prévalence observée dans les différents quartiers

La PCR a montré que 100 des 1 501 participants prélevés étaient porteurs de *Plasmodium spp*., 90% de *P. vivax* et 10% de *P. falciparum*. La prévalence globale était de 6,7% IC_{95} [5,4 - 7,0]. Cette prévalence s'est avérée très variable en fonction des quartiers, entre 0,0 et 29,5% (Figure 21). Trois quarts, 74% IC_{95} [66,5 – 83,5], des infections étaient asymptomatiques et seulement 13 cas ont été diagnostiqués par TDR.

Prévalence	2017	2018	Diff	Exhaustivité
Blondin	**29,5 (15,9-43,2)**	**2,3 (0,0-6,8)**	**-92%**	91,7%
Trois-Palétuviers	**26,1 (19,6-32,5)**	**7,2 (3,4-11,0)**	**-72%**	98,9%
Adimo	7,5 (2,4-12,6)	6,4 (1,8-11,0)	-15%	41,7%
Philogène	6,5 (0,9-12,0)	0,0 (0,0-3,9)	-100%	90,6%
Village Martin	**5,7 (2,0-13,5)**	**12,0 (0,0-24,7)**	**+110%**	42,3%
Esperance	1,9 (0,0-3,9)	1,6 (0,0-3,5)	-16%	55,8%
Crique Onozo	3,0 (0,8-5,3)	1,5 (0,0-3,3)	-50%	53,5%

Figure 21. Prévalence par PCR de *Plasmodium spp.*, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.

Facteurs de risque associés au portage de plasmodies en 2017

L'analyse multivariée a mis en évidence qu'un âge supérieur à 15 ans (et plus particulièrement la tranche 15-24 ans), vivre dans des quartiers reculés, l'anémie ou encore la thrombopénie étaient indépendamment associés à une probabilité accrue de portage de *Plasmodium spp*. Ainsi, le risque de portage était significativement plus élevé dans trois quartiers (Trois Palétuviers: RR = 7,16, p <0,01 ; Blondin: RR = 5,15, p = 0,002 et Adimo: RR = 12,43, p = 0,046). Ces quartiers sont situés près de la forêt et éloignés du centre de santé.

📖 **P41**. Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Moriceau O, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, Demar M, Odonne G, Douine M, Michaud C, Pelleau S, Djossou F, **Musset L**. Prevalence of *Plasmodium spp*. in the Amazonian border context (French Guiana-Brazil): Associated factors and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*, **2020**;102(1):130-41. *IF n-1: 2.25. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0378.*

Evaluation de l'impact de l'intervention de 2017

En 2018, les mêmes personnes ont été contactées et prélevées à nouveau. La prévalence générale du portage de plasmodies avait alors diminuée de 54% pour atteindre 2,9% IC_{95} [1,9 - 3,9] (p<0,001). La proportion de *P. falciparum* était légèrement plus importante (17%). Pendant la période écoulée entre la première intervention et la deuxième, le nombre de cas symptomatiques a également significativement diminué passant de 6,1% à 2,7% (p<0,05). Il est donc difficile de dissocier l'impact de l'intervention des variations épidémiques observées mais il semblerait que cette approche ait eu un impact sur la transmission puisque cette diminution est moins élevée chez les personnes des mêmes quartiers n'ayant pas participé à l'étude. L'impact est très certainement majoritairement lié au traitement systématique par primaquine des patients atteints par *P. vivax* ce qui est peu effectué en temps normal faute de temps, d'accès au diagnostic G6PD et du fait de l'éloignement des patients de la structure de soin qui rend leurs rendez-vous multiples difficiles. Le déploiement d'une méthode de dosage de la G6PD rapide et performante au centre de santé de Saint Georges devrait améliorer en partie la situation (cf p.63).

Connaissances et pratiques de la population, mieux les connaître afin de les améliorer

Au cours de la campagne de dépistage actif « PALUSTOP » de 2017, une enquête attitudes et pratiques a également été conduite. Les résultats de cette enquête ont montré des connaissances sur le paludisme limitées (Figure 22).

Questions posées	Réponse « Non » N (%)
Concernant les moyens de prévention	
« les traitements peuvent-ils prévenir le paludisme ? »	791 (93,7%)
Concernant les recours thérapeutiques	
« les médicaments peuvent-ils guérir le paludisme ? »	221 (26,2%)
Concernant les modes de transmission	
« Les moustiques transmettent ils le paludisme ? »	227 (26,9%)
Concernant les symptômes du paludisme	
« la fièvre est-elle un symptôme du paludisme ? »	451 (53,4%)

Figure 22. Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.

Ce niveau de connaissances était d'autant plus limité que les personnes interrogées étaient jeunes (moins de 25 ans, p = 0,013), qu'elles vivaient dans un quartier amérindien éloigné (p < 0,001) ou que leur activité était agriculteur, retraité ou sans emploi (p<0,001). Le bon niveau de connaissances était lui associé au fait de parler brésilien (p<0,001) ou d'avoir accès à différentes sources d'information (p<0,001).

L'étude de la langue maternelle des individus a permis de recenser 35% de lusophones, 34% de personnes parlant une langue amérindienne, 24% de créolophones (incluant une grande partie de personnes d'origine amérindienne) et 7% de francophones (Figure 23). Ainsi, les messages en langue française ou de concept occidental avaient peu de chance d'atteindre leur cible. Nous nous sommes par exemple rendu compte que la fièvre est difficilement identifiable telle qu'on la décrit le plus souvent pour les populations de ces quartiers. De ce fait, difficile de comprendre les messages d'éducation qui disent d'aller consulter au moindre signe de fièvre.

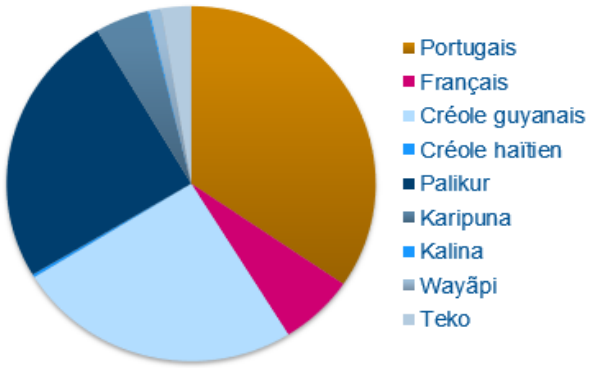


Figure 23. Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.

Au cours de cette étude, nous avons aussi testé différents outils d'éducation au paludisme tel que le théâtre forum, qui consiste à faire jouer aux participants une situation de la vie réelle en lien avec le paludisme, ou encore le photo langage, pratique qui consiste à montrer aux apprenants plusieurs images sur le thème du paludisme dans le contexte local afin de susciter la discussion et la recherche de solution collectivement. Des images animées à transmettre via les réseaux sociaux ont également été conçues et testées. Toutes les approches n'ont pas fonctionné de la même manière en fonction de l'origine culturelle ou de l'âge des participants.

2017. Une étudiante en master 2, pédiatre, a été associée à la conception du questionnaire de manière à formuler clairement les questions et former de manière homogène les médiateurs qui devaient les poser. Elle a réalisé ce travail en quatre mois de stage au cours duquel elle a testé le questionnaire sur un échantillongage de 30 personnes. Je l'ai co-encadrée avec Emilie Mosnier.

Bio-écologie des vecteurs et modalités de transmission à Trois Palétuviers

La bio-écologie des vecteurs a été conduite en collaboration avec l'unité d'entomologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane dans le cadre de leur programme de recherche CONTROLE, financé également par les fonds européens régionaux FEDER. Lors de l'épidémie de 2017, 1218 anophèles ont été capturées dans le village de Trois-Palétuviers au cours de quatre missions de piégeage espacées d'un mois chacune. A 99%, il s'agissait d'*An. Darlingi*. Deux femelles uniquement ont été testées positives à *P. vivax* (prévalence = 0,16%). Ces deux moustiques infectés ont été capturés à la bordure du village, à moins de 50 mètres de la forêt. Il est ressorti des analyses conjointes des données que si tout le village est englobé dans un groupe « à risque pour les cas *asymptomatiques* de paludisme », le centre du village est significativement associé à moins de cas *symptomatiques.* Ce constat est probablement lié à la plus grande densité d'*An. darlingi* en bordure de village qu'au centre. Ainsi, les habitants de la bordure sont probablement plus exposés, et donc infectés que les autres.

Ce projet a fait l'objet de nombreuses présentations orales et affichées. Il a également été à l'origine d'une revue en français décrivant les projets de recherche opérationnelle conduits en Guyane associant une approche de santé communautaire.

📖 **R6**. Mosnier E, Garancher L, Galindo M, Djossou, FM, Moriceau O, Hureau-Mutricy L, Silva Barbosa R, Lambert Y, Lazrek Y, **Musset L**, Douine M. Paludisme en Guyane : des projets de recherche opérationnelle originaux s'appuyant sur la santé communautaire. *La lettre de l'infectiologue*, **2020**;35(2): 50-7. *Accessible en ligne*.

Les perspectives autour de PALUSTOP sont nombreuses et pour beaucoup déjà engagées : analyse des résultats issus de l'enquête CAP, analyse sérologique des plasmas des personnes incluses en lien avec les données individuelles associées, analyse de l'usage des plantes par les gens de l'Oyapock en cas de fièvre/paludisme, analyse de la diversité génétiques des parasites circulant dans cette zone de transmission…

Dans la suite de ce projet, le CNR souhaite également élaborer un programme d'actions d'éducation à la population basé sur l'élaboration d'un kit pédagogique à destination des primaires. L'objectif serait alors de sensibiliser l'ensemble des classes de CM_1/CM_2 des zones d'endémie tous les deux ans. Ce kit incluera différentes illustrations et outils culturellement pertinents envers le public cible pour parler du paludisme et rattacher cela aux programmes pédagogiques du cycle 3 de l'école primaire. Cette approche est en partie financée par le Rotary club international. D'autres financements seront également nécessaires.

Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017

Porteurs : *E. Mosnier, infectiologue, Centres Dlocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne*
Collaborations : *E. Roux IRD Espace-dev*

En 2017, en même temps que PALUSTOP était en cours, la Guyane, ainsi que de nombreux pays d'Amérique de Sud, a fait face à une augmentation du nombre de cas de paludisme par rapport aux années précédentes. Cette hausse a été principalement le fait d'un foyer épidémique à *Plasmodium vivax* sur la commune frontalière avec le Brésil, de St Georges de l'Oyapock (STG), entre juillet et décembre 2017. Cet accroissement a également été décrit dans les états voisins brésiliens notamment du Pará et de l'Amapá.

Au total, 219 personnes ont présenté un accès à *P. vivax* sur la période d'étude. Parmi ceux-ci, 27% (n=59) ont présenté au moins une reviviscence (survenue d'un nouvel accès TDR positif à *P. vivax* > 7 jours et < 90 jours après le dernier). L'âge médian était de 22 ans [20-24], le sexe ratio H/F de 1,23. Le taux d'attaque était de 5,5% à l'échelle de la commune allant jusqu'à 51% pour le quartier de Trois Palétuviers. Le pic épidémique a été atteint en novembre 2017 et 16% (n=31/188) des patients ayant bénéficié d'un dosage de l'activité enzymatique en G6PD présentaient une activité inférieure à la normale (N : 10-14 U/HgL), contre-indiquant l'administration de primaquine selon les recommandations de l'Autorisation Temporaire d'Utilisation. Elle ne pouvait donc pas être délivrée par l'ANSM. Seulement 6,9% des cas (n=13/188) présentaient un déficit intermédiaire selon l'OMS (< 8 U/HgL). Aucun déficit sévère n'a été retrouvé. En janvier 2018, 68% des patients avaient pu bénéficier d'un traitement complet (chloroquine et primaquine). Les enfants de moins de 18 ans et les habitants du quartier de Trois Palétuviers avaient un plus grand risque de reviviscence ($p<0,005$ et $p=0,037$). La mise en place d'une équipe comprenant des médiateurs culturels a permis d'améliorer la

couverture thérapeutique et d'atteindre 100% de prise en charge contre 10% habituellement. Les enfants sont apparus comme particulièrement à risque de reviviscences.

L'analyse conjointe des cas recensés au Brésil et en Guyane ainsi que leur temporalité d'apparition a permis de mettre en évidence la dynamique de l'épidémie. Quatre groupes de cas ont pu être identifiés dans le temps (Figure 24). Le premier est apparu côté Brésil dans la zone amérindienne de la Cabo Orange avant de toucher le centre d'Oiapoque puis de passer en France via le village de Trois Palétuviers pour ensuite toucher le bourg de St Georges. Les quartiers excentrés de St Georges, Blondin, Onozo et Espérance ont quant à eux été touchés en dernier. Les facteurs liés à la ré-augmentation des cas dans la région restent encore à déterminer même si la gestion du paludisme en zone protégée, autochtone brésilienne, l'isolement géographique, la présence d'*Anophèles darlingi* et l'emballement du foyer à Trois Palétuviers y ont possiblement contribué.

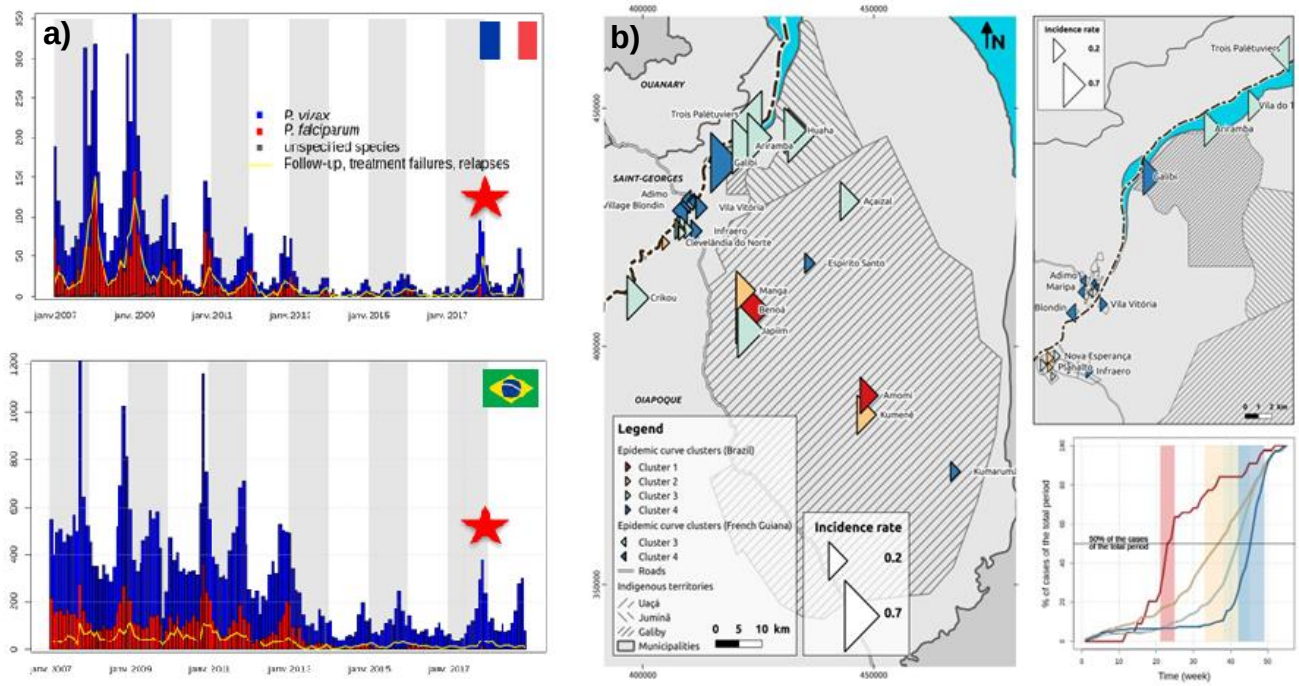


Figure 24. Caractérisation de l'épidémie de paludisme, St Georges de l'Oyapock, 2017.

a) Comparaison des cas recensés à st Georges et Oiapoque entre janvier 2007 et janvier 2018

b) Localisation des groupes de cas observés par zone géographique, région de la Cabo Orange puis carte centrée sur l'embouchure de l'Oyapock.

c) Temporalité d'expansion des quatre groupes de cas identifiés dans le temps.

📖 **P44**. Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, **Musset L**, Roux E. Resurgence risk for malaria, characterization of a recent outbreak in a Amazonian border area French Guiana/Brazil. *BMC Infect dis*, **2020**;20(1):373. *IF n-1: 2.58. DOI: 0.1186/s12879-020-05086-4*.

📖 **P45**. Saldanha R, Mosnier E, Barcellos C, Carbunar A, Charron C, Desconnets JC, Guarmit B, Do Socorro Mendonça Gomes M, Mandon T, Martins Mendes A, Peiter PC, **Musset L**, Sanna A, Van Gastel B, Roux E. Contributing to elimination of cross-border malaria through a standardized solution for case surveillance, data sharing, and data interpretation: development of a cross-border monitoring system. *JMIR Public Health Surveill*, **2020**;6(3):e15409. doi: 10.2196/15409. PubMed PMID: 32663141.

💧 La caractérisation des zones d'endémie guyanaises, que se soit en zones orpaillées ou le long des fleuves, a mis en évidence une vulnérabilité particulière de certains territoires vis-à-vis du paludisme, tout particulièrement ceux engendrant des retards au diagnostic du fait de l'éloignement des structures de soins. Aussi, il est majeur qu'au sein du plan de lutte contre le paludisme ces territoires et les spécificités qui les caractérisent soient prises en compte de manière à concevoir des approches innovantes, telle que Malakit, mais pas que. Si ces dernières doivent impliquer de modifier la réglementation souvent plus adaptée au contexte de la France hexagonale, charge à nous en tant que communauté travaillant sur le paludisme en Guyane, de les souligner pour déclencher les modifications requises.

SYNTHESE DES PERSPECTIVES

Tout au long de ce document, j'ai eu l'occasion de vous présenter les perspectives pour chacune de mes thématiques de recherche. Pour plus de lisibilité, j'ai également choisi de les regrouper dans le tableau suivant (Tableau 3). Les projets sont présentés par temporalité : court terme (CT) pour les actions qui pourront être réalisées d'ici à un an, moyen terme (MT) pour celles d'ici à deux/trois ans et long terme (LT) pour celles non envisageables dans l'immédiat. Le tableau vous présente de manière synthétique : les méthodes employées, les collaborations déployées ou envisagées, les financements déjà obtenus (DO) ou à demander (AD) ainsi que les financeurs potentiels. Les ressources humaines, déjà dédiées ou à envisager, sont également présentées tout comme la prochaine étape du projet.

Tableau 3. Tableau récapitulatif des perspectives de recherche en cours ou envisagées.

Thématique			Projet	Méthodes déployées	Collaboration	Financement		RH dédiées	Prochaine étape
Résistance	Atovaquone-proguanil	**LT**	Transmission des mutants *pfcytb* Y268S	Infections expérimentales	Unité d'entomologie IPG UMR2016 IRD - Paris Descartes	❑ DO ■ AE	ANR ?	Non	Projet à écrire
	Pipéraquine	**CT**	*ELIMALAR - REAGIR* Echecs thérapeutiques *in vivo* DHA/PI	Suivi de patients Phénotypage in vitro (PSA) Génotypage Dosages plasmatiques	Service de santé des armées	■ DO ❑ AE	SPF	Postdoctorante REAGIR - Célia	Manuscrit à finaliser
		CT	*ELIMALAR - REAGIR* Histoire de l'émergence, marqueurs associés et répartition en Amazonie	Phénotypage in vitro (PSA) Transfection Séquencage génome entier* Analyse de cluster*	Institut Evandro Chagas, Belem Fondation de Médecine Tropicale, Manaus, Brésil Ministère de la santé publique du Guyana, du Vénézuela Harvard University Broad Institute	■ DO ❑ AE	FEDER Guyamazon III CEBA PAHO	Bioinformaticienne Broad - Angela	Analyse et manuscrit à finaliser
	Artémisinines	**MT**	*ELIMALAR - REAGIR* Vitesse et mécanismes de sélection de la résistance	Pression médicamenteuses *in vitro*	UFR de Pharmacie de Toulouse	■ DO ❑ AE	FEDER SPF ROTARY	Postdoctorante REAGIR - Luana	Pressions en cours, premiers séquençages entiers à venir
		CT	Efficacité thérapeutique AR/LU	Suivi de patients Phénotypage in vitro (RSA) Génotypage Dosages plasmatiques	UMIT – LHUPM Hôpital de Cayenne	■ DO ❑ AE	SPF	Non	Dernières analyses à finaliser Manuscrit à rédiger
		LT	Transmission des mutants *pfK13* C580Y et R539T	Infections expérimentales	Unité d'entomologie de l'Institut Pasteur de la Guyane Harvard University	❑ DO ■ AE	ANR ? NIH ?	Non	Projet à écrire
	Luméfantrine	**CT**	*ELIMALAR - REAGIR* Caractérisation de la résistance	Pression médicamenteuses *in vitro*	UMIT – LHUPM Hôpital de Cayenne	■ DO ❑ AE	FEDER	Postdoctorante REAGIR - Luana	Pressions à débuter
	Evolution	**MT**	*AMAZOMICS* Evolution des populations sur le plateau des Guyanes	Séquencage génome entier* Analyse de cluster*	Harvard University Broad Institute Ministère de la santé publique du Guyana	■ DO ■ AE	FEDER CEBA NIH ? ANR ?		Analyses à approfondir
		MT	Diversité génétique de *P. vivax* en Guyane	SNP Microsatellites	Harvard University Broad Institute	■ DO ❑ AE	CEBA	Non	Manuscrit à finaliser
Diagnostic	Délétion PfHRP	**CT**	Méthode d'étude Prévalence des délétions	PCR en temps réel et nichées	Ministère de la santé du Guyana Ministère de la santé du Vénézuela	■ DO ❑ AE	SPF PAHO	Non	Nouvelles analyses Manuscrit à rédiger
	Diag multiplex	**CT**	Diagnostic des cinq espèces	PCR en temps réel multiplex	-	■ DO ❑ AE	SPF	Ingénieure de recherche Yassamine	Manuscrit à finaliser
	Dosage rapide G6PD	**CT**	*G6PD facile*	Inclusion de terrain Génotypage	LHUPM Hôpital de Cayenne	■ DO ❑ AE	ARS		Autorisations obtenues Inclusions à venir
	Porteur de gamétocytes	**MT**	*GAMETRANS*	PCR en temps réel	Radboud University Medical Center, Pays-Bas.	■ DO ❑ AE	SPF		Méthode à mettre au point

*Méthodes déployées avec nos collaborateurs. AE : à Envisager, CT : court terme (inférieur à un an), DO : Déjà Obtenu, IPG : Institut Pasteur de la Guyane, LT : long terme (plus de 3 ans), MT : moyen terme (2-3 ans).

Tableau 3 (suite)

Thématique			Projet	Méthodes déployées	Collaboration	Financement		RH dédiées	Prochaine étape
Elimination	MALAKIT	**CT**	Evaluation et limite du kit Prévalence après distribution		Porteur : CIC	■ DO ❑ AE	FEDER	Medecin	Valorisation des résultats
		CT	Adaptation du kit à *P. vivax*	Primaquine – tafénoquine G6PD	Porteur : CIC	■ DO ■ AE	FEDER ?	Medecin	Montage d'une nouvelle demande de financement
	PALUSTOP	**CT**	Connaissances Attitudes Pratiques	Analyses en composante principale, factorielle….	CIC	■ DO ❑ AE	FEDER	Master 2	Valorisation des résultats
		CT	Usage des plantes en cas de fièvre	Ethnobotanique	CNRS	■ DO ❑ AE	FEDER	Ethnobotaniste	Valorisation des résultats
		MT	Sérologie associées		IP Paris (I. Muellerà	■ DO ❑ AE	ROTARY	Ing. recherche Yassamine	Exploitation et valorisation des résultats
		LT	Diversité génétique de *P. vivax* en 2017 comparé en 2010	Microsatellites	IRBA Marseille	❑ DO ■ AE	CEBA ?	?	Obtention des derniers résultats, analyse, valorisation
	Education de la population	**MT**	*EDUPALU* en milieu scolaire	Pédagogie Approche communautaire	Inklink	■ DO ■ AE	ROTARY ARS ? FEDER ?	Equipe CNR	Demande de financement à renouveller

*Méthodes déployées avec nos collaborateurs. AE : à Envisager, CT : court terme (inférieur à un an), DO : Déjà Obtenu, IPG : Institut Pasteur de la Guyane, LT : long terme (plus de 3 ans), MT : moyen terme (2-3 ans).

Compétences transversales

Ma boite à outils

Au fil de ces années d'expérience professionnelle, 20 ans tout juste, en plus de mon bagage pharmaceutique et scientifique, j'ai pu élargir mon champ de compétences. Ce dernier fait de moi aujourd'hui l'actrice de la recherche et de la santé publique que je suis. J'ai pu tirer de chacune d'elles des enseignements et des compétences, tant au niveau professionnel que personnel. Les plus importants sont listés par ordre chronologique d'acquisition dans les pages suivantes :

- Surveillance et expertise en santé publique,
- Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires,
- Montage et gestion administrative et financière de projets,
- Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire,
- Conseillère en radioprotection,
- Encadrement et management.

Ce mémoire est assez dense, de manière à rendre sa lecture plus didactique, des symboles ont été utilisés :

Retour d'expérience et orientations professionnels et/ou personnels sur l'activité conduite

Surveillance et expertise en santé publique

Depuis le début de mon parcours j'ai souhaité m'intéresser uniquement à des activités de recherches visant à améliorer la santé des populations au plus près de leur lieu de vie et de leur problématique.

Depuis mon Doctorat, je travaille au sein d'un Centre National de Référence (CNR). Ces CNR désignés par Santé Publique France (SPF) ont pour mandat d'apporter aux autorités sanitaires une expertise diagnostique, des données de surveillance, des conseils mais aussi de les alerter en cas de phénomènes anormaux. Dans les pages précédentes, je vous ai présenté les différents projets collaboratifs que j'ai pu conduire pour répondre à ces missions. Les évaluations annuelles de SPF me laissent penser que le travail a été et est correctement mené puisque d'un CNR chimiorésistance du paludisme qui était classé C sur une échelle de A à C en 2007, nous sommes depuis 2009 notés A. Pour la période 2012-2016, nous avons eu la lourde tâche de nous regrouper avec le CNR métropolitain traîtant de la même thématique. Ainsi, depuis cette date, quatre laboratoires composent le CNR paludisme. A l'occasion de ce regroupement, j'ai été pour la première fois confrontée à la négociation budgétaire et à la nécessité de négocier au mieux notre place, dans l'intérêt du laboratoire et de notre territoire. Au dernier renouvellement, période 2017-2021, le travail fourni m'a permis d'être nommée co-coordinatrice du CNR et d'obtenir une augmentation de 20% de la dotation dédiée à notre laboratoire. Nous sommes aujourd'hui CNR du paludisme pour les zones endémiques françaises.

Dans le cadre de la surveillance du paludisme en Guyane, plusieurs techniques sont mises en œuvre :

- tests de chimiosensibilité *in vitro* vis-à-vis de 11 molécules sur les prélèvements de *P. falciparum*,
- tests de survie vis-à-vis de la dihydro-artémisinine et de la pipéraquine,
- génotypages de gènes de résistance d'intérêt (*pfcyt*b, *pfK13, pfcrt, pfpm2*…)….

Par ailleurs, nous adaptons systématiquement à la multiplication *in vitro* et avec succès l'ensemble, les isolats de *P. falciparum* reçus au laboratoire. Ceci représente un atout important dans le développement de nos programmes de recherche et le montage de nos collaborations. Nous gérons de manière rigoureuse une collection de près de 15 000 plasmas, 775 isolats cryoconservés dans 3 249 cryostabilats, plus 10 000 extraits d'ADN, des plasmas….

Cette expertise reconnue au niveau national l'a ensuite été au niveau international avec la nomination en 2014 de notre laboratoire comme Centre Collaborateur de l'OMS (CC OMS) pour la surveillance des résistances aux antipaludiques. Cette désignation a été renouvelée en 2018 pour quatre ans. A ce titre, j'interviens pour l'OMS dans la surveillance des résistances et de la pertinence des outils de diagnostic en Amazonie.

Ces activités de santé publique incluent une large part de conseils aux autorités sanitaires tant au niveau régional (suivi du plan de contrôle du paludisme, carte de risque, réponse en cas d'épidémie...), nationales (recommandations de prise en charge, groupes de travail HCSP…) que sur le plan international (réunion transfrontalières, revue de note conceptuelle, élaboration du plan stratégique mondial de l'OMS...).

Ces activités d'expertise en santé publique ont été très formatrices et m'ont imposées de prendre du recul, d'appréhender les difficultés et les limites auxquelles chacun fait face. Ainsi, j'essaie toujours d'analyser et de synthétiser au maximum toutes les informations exposées ou connues et de proposer des solutions, plausibles, et réglementairement acceptables par tous les acteurs en tenant compte de leurs priorités et leurs exigences nationales. Mon objectif est toujours de faire le lien et d'établir un pont entre les activités de recherche que nous conduisons et les décideurs de santé publique que nous cherchons à éclairer. Ceci est très régulièrement affiché par les chercheurs pour obtenir des financements en particulier, mais la mise en pratique est loin d'être évidente et effective. En effet, les temporalités, les contraintes et les priorités de chacun diffèrent. Il me parait pourtant fondamental, dans la lutte contre une pathologie, que ces deux mondes se rencontrent et se comprennent. Publier des résultats conjointement avec les programmes nationaux et permettre à ces derniers de se les approprier pour qu'ils soient intégrés dans les plans de gestion n'est pas toujours chose facile. Ceci oblige à trouver un consensus, le juste positionnement, le bon message qui permettra à l'information d'être comprise, mesurée, acceptée, et prise en compte pour mieux lutter contre la maladie.

Construction et animation d'un réseau de collaborateurs/partenaires

Les activités de santé publique peuvent difficilement se réaliser sans un réseau de partenaires large et efficace.

Au niveau local, à mon arrivée en 2007 en Guyane, je me suis attachée à renforcer la collecte des échantillons impaludés. A force de missions de sensibilisation et de contacts étroits avec les partenaires de terrain (CDPS, LBM, Hôpitaux), le recrutement s'est amélioré et a atteint depuis quelques années le palier de 75% (y compris en période d'augmentation de la transmission, Figure 25).

L'animation de ce réseau s'effectue par le biais :

- de sensibilisations périodiques sur site qui sont l'occasion pour moi de faire le point sur le paludisme en Guyane et l'actualité des résistances dans la région, les activités et missions du CNR et surtout les modalités de participation du partenaire visité,
- un accueil semestriel des nouveaux internes de l'Hôpital de Cayenne au sein du laboratoire pour une visite/sensibilisation,
- un bulletin annuel de rétro-information largement diffusé et ayant pour objectif : i) d'évaluer la participation de chaque partenaire afin de mieux cibler les actions de sensibilisation à mener, ii) d'informer sur l'état des résistances en Guyane et, iii) de faire un point sur les projets en cours et les derniers résultats obtenus.

Ce travail de fond est invisible et souvent peu considéré, mais prend un temps considérable. Cependant, il fait pour moi partie du travail de base du laboratoire permettant d'obtenir des résultats robustes sur lequels on s'appuie pour déployer des projets de recherche pertinents et représentatifs.

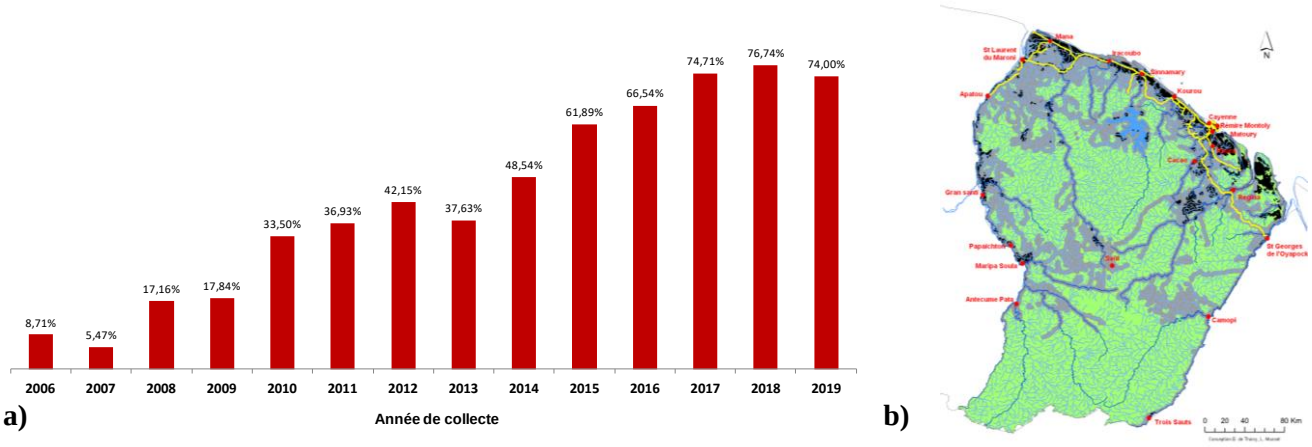


Figure 25. Exhaustivité du recrutement du CNR paludisme (a) et son réseau de partenaires guyanais (b).
Sur la carte figure en rouge les localités où sont situés les partenaires guyanais du CNR paludisme, en jaune le réseau routier, en vert la forêt primaire, en gris les zones forestières impactées par les activités humaines, en noir l'absence de forêt (savane ; marécage ; zones urbaine, d'orpaillage étendu, agricole….).

Au-delà des partenaires du diagnostic, les partenaires de la surveillance et de la gestion sont majeurs. En Guyane, ces derniers sont représentés par la cellule inter-régionale d'épidémiologie et l'Agence Régionale de Santé de Guyane avec qui nous travaillons en étroite collaboration. A cela s'ajoute la Collectivité Territoriale de Guyane qui est en charge de l'éducation de la population à la prévention du paludisme ou encore de la lutte anti-vectorielle sur le territoire.

Au niveau international, nous collaborons maintenant avec les programmes nationaux de lutte contre le paludisme des pays voisins tel que ceux du Guyana, du Suriname, du Brésil et du Vénézuela. Les échanges sont aussi permanents avec l'Organisation Panaméricaine de la Santé, notre référent régional, et le programme global de lutte contre le paludisme de l'OMS à Genève, notre référent administratif et technique.

Au XXI^{ème} siècle, plus de recherche sans collaboration !
En effet, les résultats demandés pour publier sont de plus en plus importants et les projets de plus en plus compétitifs. Par ailleurs, le laboratoire reste malgré tout une petite structure qui ne maîtrise pas toutes les techniques requises pour répondre aux questions posées. Bien que l'idéal serait que les collaborations soient une affaire d'institution et d'intérêt commun pour une zone, il s'avère que les collaborations entre chercheurs sont avant tout une aventure humaine avec des personnalités qui s'associent pour répondre à une problématique commune.
Ainsi, ces dernières années, j'ai construit un réseau de collaborateurs autour du laboratoire guidée par quatre grands principes :

- Rechercher la complémentarité,
- Respecter le partenaire et l'éthique de la recherche,
- Veiller à l'intérêt prioritaire du laboratoire mais à l'équilibre de la collaboration,
- Consolider les collaborations sur le long terme.

En Guyane, nous travaillons en très étroite collaboration avec les équipes de l'Hôpital de Cayenne (Figure 26) : le laboratoire de parasitologie-mycologie (sur le volet diagnostic), l'unité des maladies infectieuses et tropicales (sur le volet clinique et prise en charge), la coordination des CDPS (sur le volet terrain et prise en charge en milieu isolé), ou encore le centre d'investigation clinique (sur le volet investigation de terrain). Nous travaillons également avec le service de santé des armées en Guyane. Ce travail conjoint réalisé en bonne intelligence et en toute complémentarité permet à notre petit territoire sous doté en personnels de santé et scientifiques d'obtenir des résultats considérables en proportion des moyens déployés.

Figure 26. Cartographie des collaborateurs du laboratoire de parasitologie en Guyane et à l'international.
En Guyane, les points noirs et carrés gris représentent les lieux où sont situés les centres de diagnostic et de traitement du paludisme qui font partis de notre réseau de collaborateurs. Au niveau mondial, les points roses localisent les villes où sont situés les partenaires avec qui nous collaborons de manière effective. Les logos précisent les institutions concernées.

Au niveau national, nos trois partenaires du CNR permettent un travail conjoint et efficace. Ils incluent les deux laboratoires de parasitologie-mycologie de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard et de la Pitié Salpêtrière et l'unité de parasitologie et entomologie, UMR 7278, de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées. Les équipes de l'Institut Pasteur à Paris nous apportent quant à elles des capacités techniques et des compétences relatives aux études sérologiques.

Au niveau international, ce réseau s'étend aujourd'hui en grande majorité aux territoires des Amériques. Nos partenaires nord-américains nous apportent un soutien technique non négligeable sur les aspects de séquençage et d'analyse de données de génomes entiers ou encore de modification génétique parasitaire.

Par ailleurs, au-delà de ce réseau actif, après 20 ans de travail dans le domaine du paludisme et de nombreuses participations à des congrès internationaux, j'ai pu me construire un réseau professionnel large et de qualité qui est aujourd'hui un atout lorsqu'une question de recherche se pose et que nous avons besoin de partenaires pour y répondre.

Administration de la recherche

L'administration de la recherche inclut les montages et le suivi des projets et la gestion des financements associés. Elle prend aujourd'hui une part de plus en plus importante dans la vie d'une chercheuse.
C'est en 2009 que j'ai pu obtenir mon premier et modeste soutien financier en collaboration avec notre partenaire de Marseille. Au fil du temps, mes prérogatives se sont élargies, notamment en 2012 quand j'ai pris la responsabilité du CNR paludisme et de sa dotation de l'Institut National de Veille Sanitaire à l'époque d'une valeur annuelle de 185 000€, 215 000€ depuis 2017 (Figure 27). Au-delà des dotations « santé publique », j'ai commencé à demander régulièrement des financements pour des projets de recherche. Les fonds dédiés disponibles pour réaliser ma recherche dépassent, depuis 2017, les 100 000€ par an. L'objectif est de poursuivre dans ce sens avec le soutien de mon institution malgré sa trésorerie limitée. En effet, les avances sur financement sont réduites pour certains financements tels que les FEDER, ce qui impose à l'institution d'avancer les fonds et de disposer d'une trésorerie suffisante.

Mes premières compétences en comptabilité ont été acquises au cours de mes études pharmaceutiques. Ensuite, elles se sont enrichies *via* la copropriété que je gère et qui nécessite une comptabilité en partie double, ou encore mon implication dans des bureaux d'associations sportives. Je suis ainsi plutôt familière des catégories comptables et de l'analyse des bilans. Je trouve une certaine satisfaction à suivre et gérer financièrement mes projets de manière à les dimensionner au mieux et à les réaliser dans les limites de leur budget. Ainsi, la construction du budget prévisionnel du laboratoire m'intérèsse car elle permet de formaliser et décliner financièrement la vision que j'ai du laboratoire et de ses activités pour l'année à venir.

Par ailleurs, les contraintes réglementaires sont de plus en plus présentes, fastidieuses et nécessitent des connaissances légales approfondies qu'il est difficile de maîtriser totalement pour un chercheur sans l'appui des fonctions supports. Ainsi, les services support à la recherche jouent un rôle majeur aujourd'hui, d'appui aux demandes éthiques, d'appui aux demandes réglementaires. Avec toutes ces contraintes, la recherche coûte de plus en plus chère et l'argent dédié à la science en elle-même proportionnellement se réduit.

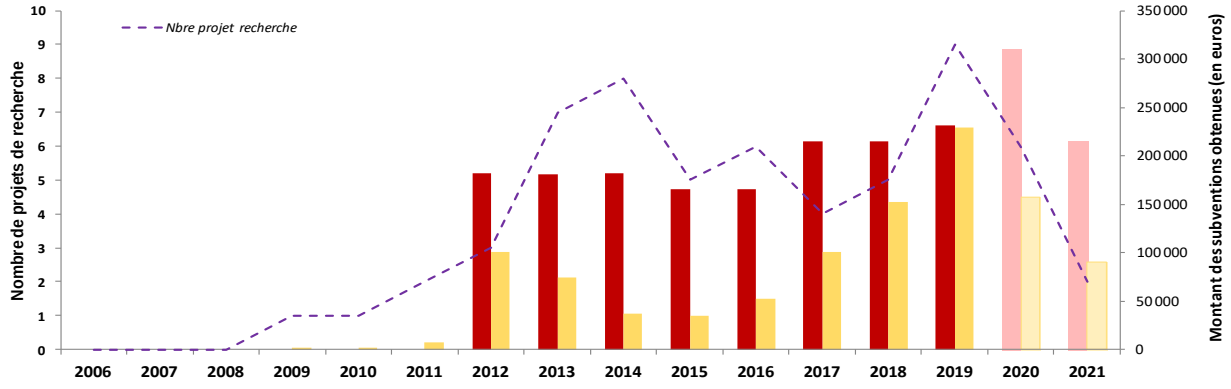


Figure 27. Nombre de projets annuels et montants associés (hors subvention MESR).
Les histogrammes représentent le montant des fonds dédiés à la santé publique (en rouge) et à la recherche (en jaune). MESR : Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche. Seul un prévisionnel est présenté pour 2020 et 2021.

De mon expérience professionnelle, il ressort que je passe environ 60 à 70% de mon temps à rédiger, relire, construire des documents administratifs de synthèse, gérer le laboratoire et ses approvisionnements, animer le réseau de partenaires, rédiger des rapports en tout genre (ou mémoire en vue de soutenance d'HDR !). Ainsi, je dédie environ 30% uniquement à mon cœur de métier : suivre l'actualité scientifique, réfléchir à de nouvelles questions de recherche, orienter les manipulations en cours, etc… Je compare souvent un chercheur à un chef d'entreprise qui doit chercher des fonds pour disposer de ressources humaines et de moyens dédiés à sa recherche mais sans l'autonomie associée. Ainsi, le chercheur dépend de son institution et il est fondamental pour construire des projets encore plus importants que cette dernière soit structurée, solide financièrement et pilotée par des dirigeants faisant confiance et qui permettent d'aller de l'avant.

Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 au laboratoire

Entre 2007 et 2011, mon travail s'est principalement axé sur le renforcement de la qualité au laboratoire et notamment sur le contrôle qualité des tests de chimiosensibilité *in vitro*. Je suis partie du principe que les valeurs de chimiosensibilité représentent la pierre angulaire de notre activité. En effet, utilisées en santé publique, elles sont capitales et participent à l'élaboration des recommandations de prise en charge des patients atteints du paludisme. Dans le domaine de la recherche sur les mécanismes de résistance, elles caractérisent phénotypiquement un isolat qui fera par la suite l'objet de nombreuses expérimentations. Par conséquent, la qualité des tests se devait d'être irréprochable et maîtrisée.

Fin 2012, il a été acté par la Direction Générale de la Santé que les laboratoires de référence et d'expertise dont nous faisions partie, rendaient des résultats nominatifs, étaient considérés comme des laboratoires de biologie médicale (lettre DGS du 23 mars 2012). Ainsi, nous devions répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 (ordonnance du 13 janvier 2010, loi du 30 mai 2013 relatives à la biologie médicale). De par mon implication et ma responsabilité vis-à-vis du CNR, j'ai été désignée correspondante qualité de notre laboratoire de 2012 à 2015, date à laquelle je suis devenue, et suis toujours, suppléante de cette fonction.

A l'origine, cette démarche a été conduite avec l'appui du service qualité, environnement et développement durable de l'Institut Pasteur à Paris et grâce au suivi personnalisé de la société PREISO. Un membre de cette société était en charge de nous accompagner dans cette démarche. L'accréditation de notre site a ensuite été obtenue en août 2017.

Une technique entre dans le champ de cette accréditation, le diagnostic différentiel d'espèce plasmodiale par PCR en temps réel. Cette technique a été mise au point au sein du laboratoire. Elle permettait le diagnostic de quatre espèces au sein de deux multiplex. Nous sommes en train de valider la méthode à partir d'une matrice buvard et en y incluant la détection de *P. knowlesi*. Elle inclut donc six paramètres en comptant la détection du gène la macroglobuline comme témoin positif d'extraction. Cette méthode passe avec succès des contrôles externes de la qualité depuis 2014 et a été une des meilleures méthodes lors de l'essai inter-laboratoire que nous avons réalisé au sein du CNR. En effet, elle consomme peu d'ADN, est sensible et spécifique. Il est envisagé de publier cette méthode fin 2020 début 2021.

Notre système de management de la qualité inclut un outil logiciel, Kalilab®, dont je suis administratrice au laboratoire et qu'il a fallu déployer et paramétrer. A ce jour, nous gérons grâce à ce logiciel nos documents, nos équipements, nos fiches qualités et nos habilitations.

La tâche la plus fastidieuse a été de mettre en place les premières versions des documents, et encore davantage quand il s'agissait des documents généraux visant à harmoniser les pratiques entre les différents laboratoires. Cela nous a obligé à repenser nos modes de fonctionnements et les harmoniser au niveau de l'Institut. A notre échelle, ceci nous a permis d'optimiser les pratiques et d'augmenter le niveau de traçabilité des activités. Cette démarche a été très difficile les premières années mais nous permet aujourd'hui de disposer d'un système abouti au sein duquel le personnel du laboratoire se retrouve, et trouve avantage, même les plus réticents. Ce mode de fonctionnement s'étend à l'ensemble de nos activités de recherche même si toutes nos techniques ne font pas l'objet d'une validation de méthode.

Au cours de cette démarche, j'ai été amenée à donner beaucoup de ma personne et initier énormément de choses de mon propre chef pour, qu'au fur et à mesure, je puisse convaincre, obtenir l'adhésion et enfin emmener l'équipe avec moi. Je me suis toujours appliquée à ne « faire de la qualité » que dans l'objectif d'améliorer nos pratiques/résultats avant tout et non pour répondre aux auditeurs. Après quatre ans d'un tel fonctionnement, je constate que l'équipe y adhère et aurait aujourd'hui beaucoup de difficultés à fonctionner autrement car, avec le temps, tout le monde est convaincu de sa pertinence malgré le haut niveau d'investissement demandé.

2009. Les débuts du système documentaire ont été mis en place en collaboration avec une étudiante en deuxième année d'école d'ingénieur de biologie industrielle, secteur qualité.

2015. Son déploiement total a été finalisé avec l'appui d'une technicienne qualité dédiée.

2017-2020. La validation de méthode a été réalisée avec l'aide d'une ingénieure de recherche, Y. Lazrek. Elle devrait être publiée et valorisée au dernier trimestre 2020.

Conseillère en radioprotection

La réalisation des tests de chimiosensibilité isotopiques nécessite l'utilisation d'hypoxanthine tritiée. Cette manipulation/détention de radioéléments requière la présence d'une personne compétente en radioprotection (PCR) qui gère :

- Les demandes d'autorisation auprès de l'Agence de Sécurité Nucléaire (ASN),
- Le zonage des locaux de manipulation,
- L'approvisionnement en source radioactives.
- Le suivi des manipulateurs,
- Les déchets (stockage, évacuation, reprise par l'ANDRA),
- Les contrôles réglementaires,
- Les audits internes et externes.

Pour assurer cette fonction, il est nécessaire d'avoir suivi une formation initiale d'une quinzaine de jours, généralement au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives). Les compétences sont ensuite mises à jour tous les cinq ans par le biais de renouvellement de fromation d'une durée de cinq jours. De 2010 à 2015, j'ai été suppléante de cette fonction. Depuis 2015, j'en ai la charge admnistrative, épaulée par une autre PCR pour les aspects techniques.

A cette date, j'ai procédé à une remise à plat de l'ensemble de l'organisation de ces activités et des procédures associées. Un manuel dit « didactique » a également été conçu de manière à visualiser en quelques diapositives, le système mis en place ainsi que l'ensemble des activités et documents qui s'y rattachent. L'ensemble de ces documents est référencé dans le système documentaire global du laboratoire.

Les actions autour de la radioprotection ont été similaires à celles de la démarche qualité NF EN ISO 15189. Très chronophages au départ, le temps de remettre à plat le système, elles ont ensuite permis d'aboutir à un fonctionnement optimisé, fluide au quotidien. Cela nous fait aujourd'hui gagner beaucoup de temps et nous permet surtout de respecter l'ensemble des obligations sans difficulté. Le fonctionnement choisi a d'ailleurs été reconnu et validé par l'ASN lors de son audit de mars 2015.

Encadrement d'équipe et management

Je suis responsable d'un laboratoire comptant 5 à 9 personnes depuis cinq ans. Dans ce cadre, je définis la stratégie scientifique et les orientations du laboratoire en veillant à maintenir : i) une cohérence dans les projets développés, ii) une adéquation avec les ressources disponibles et iii) un dynamisme et une implication de l'équipe. L'équipe est petite, je dois donc veiller à choisir les thématiques les plus pertinentes, valorisables, et qui nous permettent d'être compétitifs. Les points forts sur lesquels je m'appuie sont : i) nos connaissances du terrain, ii) l'accès aux échantillons et les collections disponibles, iii) notre réseau de partenaires et, iv) la maîtrise de techniques de pointe en culture cellulaire. Je privilégie la qualité des publications plutôt que le nombre. Mon défi est d'arriver à maintenir l'effectif du laboratoire au dessus des ressources de base nécessaires à son fonctionnement quotidien (surveillance, aspects administratifs et réglementaires notamment), car se sont ces ressources qui nous permettent d'avancer efficacement côté recherche et de créer une émulation scientifique au sein de l'équipe.

Une fois la stratégie définie, elle est exposée à l'ensemble des acteurs du laboratoire pour qu'ils se l'approprient. Pour ce faire, je présente chaque année un bilan des activités de l'année précédente en lien avec les objectifs qui avaient été fixés et les objectifs de l'année à venir. Je veille tout particulièrement à ce que les activités soient proportionnées aux moyens dédiés et à ce que chacun y trouve épanouissement en fonction des compétences dont il dispose.

D'un point de vue individuel, je réalise un entretien individuel à mi-année, afin de réserver un moment d'échange privilégié avec chacun de mes collaborateurs en dehors des entretiens individuels formels. J'organise également des réunions de service hebdomadaires visant à coordonner les activités, expliquer les choix et les ajustements, écouter les difficultés rencontrées ou les suggestions et à ce que tout le monde soit au même niveau d'information. Elles font toutes l'objet d'un compte-rendu. Cette activité de management me prend environ 10% de mon temps, parfois plus, mais est indispensable à la cohésion de l'équipe.

Au cours de ces vingt années de recherche, j'ai accompagné 33 étudiants de différents niveaux (Figure 28). La moitié avait un niveau master ou plus et incluait deux thèses d'exercice et une thèse de science en co-direction. Cette contribution à la formation des plus jeunes est pour moi une composante fondamentale de l'activité d'un chercheur. Un scientifique doit pouvoir transmettre son savoir et son savoir-faire, initier les plus jeunes à une culture scientifique et une approche méthodologique rigoureuse basée sur un esprit critique et rationnel qui s'enrichit de l'expérience de la communauté, au sens large, qui nous entoure. Trois personnes ont beaucoup compté au cours de mon parcours, M. Le Bras, mon directeur de thèse, M. Fidock, mon partenaire scientifique depuis mon post-doctorat et M. Spiegel, paludologue de terrain, directeur de 2007 à 2012 de l'Institut Pasteur de la Guyane. Ainsi, au cours de mes encadrements, j'essaie de transmettre ce qu'ils m'ont eux-mêmes transmis : probité, respect, confiance, rigueur, engagement, bienveillance, sincérité et goût du travail bien fait. Le monde de la recherche est un monde rude, de plus en plus compétitif, au sein duquel il est important de rester fidèle à ses valeurs et ce pourquoi on fait les choses.

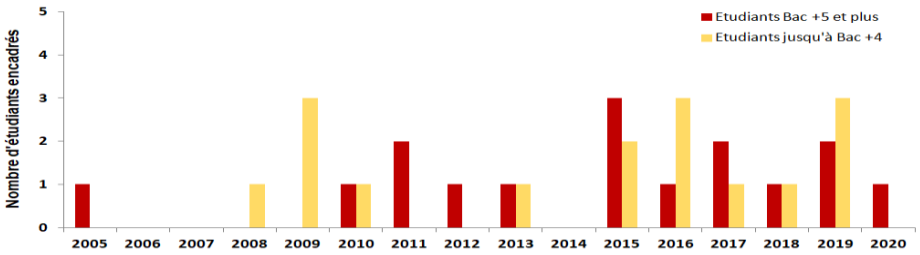


Figure 28. Nombre d'étudiants encadrés par an et par niveau de formation.
Les encadrements sur plusieurs années (ex : thèse, postdoc) ne figurent qu'une fois l'année d'arrivée au laboratoire.

Au fil du temps et des expériences, j'ai appris à davantage observer les compétences et les capacités de chacun afin d'adapter mes attentes. Chaque individu est différent avec ses forces et ses faiblesses et il est important d'en tenir compte pour obtenir le meilleur de chacun. Par ailleurs, au fil du temps, j'ai aussi davantage structuré une période de stage en entrant moins rapidement dans les manipulations et en imposant à l'étudiant de commencer par présenter le sujet dont il a la charge. Cet exercice permet d'évaluer efficacement les capacités de compréhension et de synthèse d'un individu et là encore, de s'adapter.

Mise en perspective de mon parcours

Engagement, Rigueur, Pragmatisme, et Constance

Vous avez pu au cours de ce document apprécier le travail que j'ai pu accomplir en tant que chercheuse au cours de ces vingt dernières années et la contribution que j'ai pu apporter aux enjeux des thématiques que j'étudie et des questions de santé publique associées. J'ai suivi un parcours que j'estime cohérent et acquis une formation complète qui a débutée en étudiant le paludisme d'importation des voyageurs parisiens de retour d'Afrique de l'Ouest, et se déroule aujourd'hui en zone d'endémie sud-américaine. Tout cela en passant par un laboratoire universitaire de grande qualité au cours de mon postdoctorat qui m'a permis d'élargir mon panel de techniques maitrisées. Ainsi, j'aborde la recherche en santé publique comme un concept global qui se veut pluridisciplinaire, transversal et translationnel, allant du malade au laboratoire en passant par les lieux de prise en charge en zone de transmission. Dans le monde de la recherche actuel, compétitif et exigeant, je me suis toujours attachée à mener à bien mes projets avec rigueur et pugnacité en toute complémentarité avec mes partenaires et en privilégiant toujours la qualité à la quantité. Ainsi, cela m'a permis d'être aujourd'hui à l'origine ou associée à cinquante publications dont cinq revues, et mes perspectives en termes de recherche sont nombreuses, présentées au fil de ce document.

Au delà de ces aspects recherche, ma formation initiale de pharmacienne ne m'a jamais quittée. Elle m'a apporté la rigueur nécessaire et le sens des responsabilités vis-à-vis des patients mais aussi aujourd'hui, envers les étudiants et personnels que j'encadre au quotidien. Mon engagement a toujours eu vocation à répondre aux enjeux de la prise en charge et du diagnostic des malades atteints de paludisme et à apporter un éclairage scientifique, ainsi que des données fiables aux décideurs de santé publique. Le serment de Galien que j'ai prêté mi-2002 m'anime depuis le début, « *Exercer dans l'intérêt de la santé publique,…..ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.* » Travailler toujours dans l'intérêt des malades et des habitants d'une zone à risque me motive et m'anime. J'exerce depuis 12 ans en Guyane, zone d'endémie certes, mais pays de mon enfance, carrefour de tant de cultures, de spécificités et d'opportunités. Territoire riche de 300 000 habitants représentatifs d'une grande partie des cultures de cette planète et territoire d'une sous-région incluant de nombreux pays, petits ou grands, si différents mais partageant un environnement similaire et des populations communes. Ce qui me motive c'est respecter au maximum ces individus, comprendre leur mode de fonctionnement et les limitations qu'ils rencontrent face à la maladie, faire entendre nos spécifités et nos problématiques tellement différentes de celles de la France hexagonale pour déployer collectivement des approches adaptées, pragmatiques et innovantes. C'est forte de mon expertise que je tente en permanence de faire le lien entre le monde de la recherche et le monde des décideurs en santé publique locaux, nationaux ou internationaux. Vulgariser les données scientifiques et leurs implications pour que les décideurs y adhérent et les prennent en compte pour faire évoluer les programmes de lutte contre la maladie. Faire aussi le lien entre le temps long des décisions/concertations publiques, de la recherche et des démarches administratives associées et le temps court, d'un besoin immédiat d'une meilleure prise en charge des patients.

En tant que professionnel de santé, j'exerce aujourd'hui un métier multi facettes : pharmacienne, chercheuse, biologiste médicale et enseignante. Depuis mai 2019, j'ai également des responsabilités de conseillère à l'ordre des pharmaciens. Mes journées sont riches, toutes différentes et intéressantes. De nature dynamique, curieuse, motivée et sincère, mes mentors m'ont également transmis avec bienveillance des valeurs de probité, de rigueur et d'impartialité qui animent aujourd'hui la pharmacienne-chercheuse-biologiste que je suis. Je transmets à mon tour ces valeurs et les connaissances dont je dispose aux étudiants que j'encadre. Obtenir cette habilitation à diriger des recherches serait pour moi la reconnaissance par mes pairs, de mon parcours et de mes compétences. Cela représente aussi pour moi la possibilité d'évoluer vers des projets de plus grande envergure avec mes partenaires et avec la confiance et le soutien de mes institutions.

Bibliographie

Alavi, Y., M. Arai, J. Mendoza, M. Tufet-Bayona, R. Sinha, K. Fowler, O. Billker, B. Franke-Fayard, C. J. Janse, A. Waters and R. E. Sinden (2003). "The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum, and their transmission by Anopheles stephensi, Anopheles gambiae and Aedes aegypti." Int J Parasitol **33**(9): 933-943.

Anderson, T. J. and C. Roper (2005). "The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers." Acta Trop **94**(3): 269-280.

Ariey, F., B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A. C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Menard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon and D. Menard (2014). "A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria." Nature **505**(7481): 50-55.

Awasthi, G. and A. Das (2013). "Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(8): 947-961.

Barry, A. E., A. Waltmann, C. Koepfli, C. Barnadas and I. Mueller (2015). "Uncovering the transmission dynamics of Plasmodium vivax using population genetics." Pathog Glob Health **109**(3): 142-152.

Basco, L. K. and P. Ringwald (2001). "Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon." J Infect Dis **183**(12): 1828-1831.

Blasco, B., D. Leroy and D. A. Fidock (2017). "Antimalarial drug resistance: linking Plasmodium falciparum parasite biology to the clinic." Nat Med **23**(8): 917-928.

Chen, N., D. E. Kyle, C. Pasay, E. V. Fowler, J. Baker, J. M. Peters and Q. Cheng (2003). "pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates from the Philippines." Antimicrob Agents Chemother **47**(11): 3500-3505.

Chenet, S. M., S. Akinyi Okoth, C. S. Huber, J. Chandrabose, N. W. Lucchi, E. Talundzic, K. Krishnalall, N. Ceron, L. Musset, A. Macedo de Oliveira, M. Venkatesan, R. Rahman, J. W. Barnwell and V. Udhayakumar (2016). "Independent Emergence of the Plasmodium falciparum Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana." J Infect Dis **213**(9): 1472-1475.

Cortese, J. F., A. Caraballo, C. E. Contreras and C. V. Plowe (2002). "Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America." J Infect Dis **186**(7): 999-1006.

de Santana Filho, F. S., A. R. Arcanjo, Y. M. Chehuan, M. R. Costa, F. E. Martinez-Espinosa, J. L. Vieira, M. G. Barbosa, W. D. Alecrim and M. G. Alecrim (2007). "Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon." Emerg Infect Dis **13**(7): 1125-1126.

Dipanjan, B., G. Shivaprakash and O. Balaji (2017). "Triple Combination Therapy and Drug Cycling-Tangential Strategies for Countering Artemisinin Resistance." Curr Infect Dis Rep **19**(7): 25.

Durrand, V., A. Berry, R. Sem, P. Glaziou, J. Beaudou and T. Fandeur (2004). "Variations in the sequence and expression of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (Pfcrt) and their relationship to chloroquine resistance in vitro." Mol Biochem Parasitol **136**(2): 273-285.

Ecker, A., A. M. Lehane, J. Clain and D. A. Fidock (2012). "PfCRT and its role in antimalarial drug resistance." Trends Parasitol.

Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naude, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe and T. E. Wellems (2000). "Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance." Mol Cell **6**(4): 861-871.

Gamboa, D., M. F. Ho, J. Bendezu, K. Torres, P. L. Chiodini, J. W. Barnwell, S. Incardona, M. Perkins, D. Bell, J. McCarthy and Q. Cheng (2010). "A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests." PLoS ONE **5**(1): e8091.

Henry, N. B., S. S. Serme, G. Siciliano, S. Sombie, A. Diarra, N. Sagnon, A. S. Traore, S. B. Sirima, I. Soulama and P. Alano (2019). "Biology of Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio and implications in malaria parasite transmission." Malar J **18**(1): 70.

Joy, D. A., X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. J. White, E. Suh, P. Beerli and X. Z. Su (2003). "Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum." Science **300**(5617): 318-321.

Kahn, S. M., W. Jiang, T. A. Culbertson, I. B. Weinstein, G. M. Williams, N. Tomita and Z. Ronai (1991). "Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification." Oncogene **6**(6): 1079-1083.

Kim, J., Y. Z. Tan, K. J. Wicht, S. K. Erramilli, S. K. Dhingra, J. Okombo, J. Vendome, L. M. Hagenah, S. I. Giacometti, A. L. Warren, K. Nosol, P. D. Roepe, C. S. Potter, B. Carragher, A. A. Kossiakoff, M. Quick, D. A. Fidock and F. Mancia (2019). "Structure and drug resistance of the Plasmodium falciparum transporter PfCRT." Nature **576**(7786): 315-320.

Le Bras, J. and P. Deloron (1983). "In vitro study of drug sensitivity of Plasmodium falciparum: evaluation of a new semi-micro test." Am J Trop Med Hyg **32**(3): 447-451.

Marques, M. M., M. R. Costa, F. S. Santana Filho, J. L. Vieira, M. T. Nascimento, L. W. Brasil, F. Nogueira, H. Silveira, R. C. Reyes-Lecca, W. M. Monteiro, M. V. Lacerda and M. G. Alecrim (2014). "Plasmodium vivax chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon." Antimicrob Agents Chemother **58**(1): 342-347.

Nair, S., X. Li, G. A. Arya, M. McDew-White, M. Ferrari, F. Nosten and T. J. C. Anderson (2018). "Fitness Costs and the Rapid Spread of kelch13-C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance." Antimicrob Agents Chemother **62**(9).

Nair, S., D. Nash, D. Sudimack, A. Jaidee, M. Barends, A. C. Uhlemann, S. Krishna, F. Nosten and T. J. Anderson (2007). "Recurrent Gene Amplification and Soft Selective Sweeps during Evolution of Multidrug Resistance in Malaria Parasites." Mol Biol Evol **24**(2): 562-573.

Nkrumah, L. J., R. A. Muhle, P. A. Moura, P. Ghosh, G. F. Hatfull, W. R. Jacobs, Jr. and D. A. Fidock (2006). "Efficient site-specific integration in Plasmodium falciparum chromosomes mediated by mycobacteriophage Bxb1 integrase." Nat Methods **3**(8): 615-621.

Noedl, H., Y. Se, K. Schaecher, B. L. Smith, D. Socheat and M. M. Fukuda (2008). "Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia." N Engl J Med.

Okombo, J., E. Ohuma, S. Picot and A. Nzila (2011). "Update on genetic markers of quinine resistance in Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol.

Orjuela-Sanchez, P., M. C. Brandi and M. U. Ferreira (2013). "Microsatellite analysis of malaria parasites." Methods Mol Biol **1006**: 247-258.

Payne, D. (1987). "Spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum." Parasitol Today **3**(8): 241-246.

Preiser, P. R., R. J. Wilson, P. W. Moore, S. McCready, M. A. Hajibagheri, K. J. Blight, M. Strath and D. H. Williamson (1996). "Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA." Embo J **15**(3): 684-693.

Savini, H., H. Bogreau, L. Bertaux, H. Bouchiba, P. Kraemer, D. Parzy, E. Garnotel, C. Rogier, F. Simon and B. Pradines (2008). "First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in Plasmodium falciparum during treatment in a traveler in Comoros." Antimicrob Agents Chemother **52**(6): 2283-2284.

Srivastava, I. K., J. M. Morrisey, E. Darrouzet, F. Daldal and A. B. Vaidya (1999). "Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites." Mol Microbiol **33**(4): 704-711.

Talman, A. M., J. Clain, R. Duval, R. Menard and F. Ariey (2019). "Artemisinin Bioactivity and Resistance in Malaria Parasites." Trends Parasitol.

Thomas, S. M., O. Ndir, T. Dieng, S. Mboup, D. Wypij, J. H. Maguire and D. F. Wirth (2002). "In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfcrt and pfmdr1 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Senegal." Am J Trop Med Hyg **66**(5): 474-480.

Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**(4254): 673-675.

Vreden, S. G., J. K. Jitan, R. D. Bansie and M. R. Adhin (2013). "Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of Plasmodium falciparum to artemether." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(8): 968-973.

White, N. J. (1997). "Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo." Antimicrob Agents Chemother **41**(7): 1413-1422.

White, N. J. (2004). "Antimalarial drug resistance." J Clin Invest **113**(8): 1084-1092.

WHO (2018). Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. W. a. H. Organization. Geneva, World and Health Organization.

Witkowski, B., C. Amaratunga, N. Khim, S. Sreng, P. Chim, S. Kim, P. Lim, S. Mao, C. Sopha, B. Sam, J. M. Anderson, S. Duong, C. M. Chuor, W. R. Taylor, S. Suon, O. Mercereau-Puijalon, R. M. Fairhurst and D. Menard (2013). "Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies." Lancet Infect Dis **13**(12): 1043-1049.

Witkowski, B., V. Duru, N. Khim, L. S. Ross, B. Saintpierre, J. Beghain, S. Chy, S. Kim, S. Ke, N. Kloeung, R. Eam, C. Khean, M. Ken, K. Loch, A. Bouillon, A. Domergue, L. Ma, C. Bouchier, R. Leang, R. Huy, G. Nuel, J. C. Barale, E. Legrand, P. Ringwald, D. A. Fidock, O. Mercereau-Puijalon, F. Ariey and D. Menard (2017). "A surrogate marker of piperaquine-resistant Plasmodium falciparum malaria: a phenotype-genotype association study." Lancet Infect Dis **17**(2): 174-183.

Wootton, J. C., X. Feng, M. T. Ferdig, R. A. Cooper, J. Mu, D. I. Baruch, A. J. Magill and X. Z. Su (2002). "Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum." Nature **418**(6895): 320-323.

WWARN (2019). "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 Med **17**(1): 1.

Xie, S. C., C. Dogovski, E. Hanssen, F. Chiu, T. Yang, M. P. Crespo, C. Stafford, S. Batinovic, S. Teguh, S. Charman, N. Klonis and L. Tilley (2016). "Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage Plasmodium falciparum to artemisinins." J Cell Sci **129**(2): 406-416.

Annexes

J'ai choisi de vous présenter en annexe de ce document les trois publications qui me tiennent le plus à cœur.

Annexe 1

Musset L, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in Plasmodium falciparum mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol*, **2007**;24(8):1582-5.DOI: 10.1093/molbev/msm087. *IF n+2: 9.87.*

Papier réalisé à la fin de mon doctorat et qui a permis de décrire l'évolution parallèle des mutations pfcytb *responsables de la résistance à l'atovaquone-proguanil et qui étaient sélectionnées chez le patient au cours du traitement et non encore transmises par le moustique. Publication réalisée avec Jérôme et M Le Bras.*

Annexe 2

Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkmand SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA*, Neafsey DE* & **Musset L**. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a novel pfcrt mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2015**;112(37):11672-77. DOI: 10.1073/pnas.1507142112. *IF n+2: 9.66.*

L'un de mes premiers papiers que je signe en dernier auteur sur un sujet qui a fait le lien entre ma thématique de post-doctorat et celle de mon aventure professionnelle guyanaise. Sujet qui m'a obligé à bien choisir mes collaborations et veiller sans cesse à l'intérêt premier du laboratoire. Là encore, description d'un phénomène adaptatif lié à la résistance aux antipaludiques et qui, au-delà de la chloroquine, nous emmène aujourd'hui sur la compréhension du mécanisme de résistance d'une autre amino-4-quinoléine, la pipéraquine.

Annexe 3

Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, **Musset L**. Local emergence and clonal propagation in eastern Amazonia of *Plasmodium falciparum k13* C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*, **2020**;9:e51015. DOI: 10.7554/eLife.51015. *IF n-1: 7.55.*

Papier issu de mon premier encadrement d'une doctorante avec mes collaborateurs de longue date. Toujours associé terrain et manipulations de laboratoire poussées. Peut-être aurait-il été possible de sortir encore un peu plus haut mais mon expérience en termes de rédaction de publication et la notoriété de l'équipe limitent peut être encore un tel aboutissement.

Les suppléments sont accessibles en ligne pour chaque publication.