

1 **Variation génétique à l'échelle du génome et surveillance moléculaire de la résistance**
2 **aux médicaments dans les isolats de *Plasmodium falciparum* provenant des personnes**
3 **asymptomatiques à Ouélessébougou, au Mali.**

4

5 Leen N. Vanheer¹, Almahamoudou Mahamar², Emilia Manko¹, Sidi M. Niambele², Koualy
6 Sanogo², Ahamadou Youssouf², Adama Dembele², Makonon Diallo², Seydina O. Maguiraga²,
7 Jody Phelan¹, Ashley Osborne¹, Anton Spadar¹, Merel J. Smit³, Teun Bousema³, Chris
8 Drakeley¹, Taane G. Clark^{1,4}, William Stone¹, Alassane Dicko², Susana Campino¹

9

10 ¹ Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London,
11 UK

12 ² Malaria Research and Training Centre, Faculty of Pharmacy and Faculty of Medicine and Dentistry,
13 University of Sciences Techniques and Technologies of Bamako, Bamako, Mali

14 ³ Department of Medical Microbiology and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud
15 University Medical Center, Nijmegen, Netherlands

16 ⁴ Faculty of Epidemiology and Population Health, London School of Hygiene & Tropical Medicine,
17 London, UK

18

19

20

21 Auteurs correspondants

22 Dr. Leen Vanheer et Prof. Susana Campino

23 Department of Infection Biology

24 London School of Hygiene & Tropical Medicine,

25 London WC1E 7HT, UK

26 leen.vanheer@lshtm.ac.uk, susana.campino@lshtm.ac.uk

27

28

29 **Résumé**

30 L'analyse de la séquence des parasites *Plasmodium falciparum* est utile pour garantir le succès durable
31 des programmes de lutte contre le paludisme. Les technologies de séquençage du génome entier donnent
32 un aperçu de l'épidémiologie et de la variation à l'échelle du génome des populations de *P. falciparum*
33 et peuvent caractériser les changements géographiques et temporels. Cela est particulièrement important
34 pour surveiller l'émergence et la propagation de parasites de *P. falciparum* résistants aux médicaments,
35 qui menacent les programmes de lutte contre le paludisme dans le monde entier. Nous présentons ici
36 une caractérisation détaillée de la variation génétique à l'échelle du génome et des profils de résistance
37 aux médicaments chez des personnes asymptomatiques dans le sud-ouest du Mali, où la transmission
38 du paludisme est intense et saisonnière, et où le nombre de cas a récemment augmenté. Des échantillons
39 collectés à Ouélessébougou, au Mali (2019-2020 ; n=87) ont été séquencés et placés dans le contexte
40 d'isolats de *P. falciparum* maliens (2007-2017 ; n=876) et africains (n=711) plus anciens. Notre analyse
41 a révélé une forte multiclonalité et une faible parenté entre les isolats, ainsi que des fréquences accrues
42 de marqueurs moléculaires de résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la luméfantrine, par
43 rapport aux isolats maliens plus anciens. En outre, 21 gènes soumis à une pression sélective ont été
44 identifiés, dont un candidat vaccin bloquant la transmission (*pfCelTOS*) et un locus d'invasion
45 érythrocytaire (*pfdblmsp2*). Dans l'ensemble, notre travail fournit l'évaluation la plus récente de la
46 diversité génétique de *P. falciparum* au Mali, un pays où le paludisme occupe la deuxième place en
47 Afrique de l'Ouest, ce qui permet d'éclairer les activités de lutte contre le paludisme.

48

49

50

51

52

53 INTRODUCTION

54 On estime que le paludisme sera à l'origine de 250 millions de maladies dans le monde et de 619 000
55 décès associés rien qu'en 2021. Le Mali fait partie des 9 pays où la charge de morbidité du paludisme
56 est la plus élevée et le nombre de cas de paludisme a augmenté entre 2016 et 2021 [1]. La plupart des
57 cas de paludisme au Mali et dans le reste de l'Afrique subsaharienne sont causés par *Plasmodium*
58 *falciparum*, le parasite le plus virulent du paludisme humain. Le Mali est divisé en cinq zones
59 écoclimatiques [2] à travers lesquelles la transmission du paludisme fluctue. La zone du Sud-Ouest a
60 les taux d'incidence de *P. falciparum* les plus élevés et la transmission est fortement saisonnière,
61 coïncidant avec la saison des pluies annuelle. Cependant, dans les différentes régions du sud-ouest du
62 Mali, le degré de transmission pérenne et saisonnière et varie, tout comme le moment de la saison des
63 pluies, ce qui entraîne une hétérogénéité des saisons de transmission et de l'épidémiologie du paludisme
64 [2].

65

66 Conformément aux directives de l'OMS, les stratégies actuelles d'intervention contre le paludisme au
67 Mali comprennent des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour le paludisme
68 simple à *P. falciparum*, l'artéméther-luméfantrine (AL) étant le traitement de première intention. Les
69 stratégies de chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS), consistant en l'association de
70 sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine (SPAQ) chez les enfants et le traitement préventif
71 intermittent des femmes enceintes (IPTp) avec la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) seulement, ont été
72 largement mises en œuvre dans les pays africains et ont été introduites au Mali à partir de 2012 et de
73 2015, respectivement.

74

75 Outre les perturbations dues à la pandémie de COVID-19, l'augmentation de l'incidence de la maladie
76 a été liée à l'émergence et à la propagation de parasites *P. falciparum* résistants aux médicaments [1].
77 Les souches résistantes à la SP, aux dérivés de l'artémisinine et aux médicaments partenaires constituent
78 un défi majeur dans la lutte contre le paludisme [3]. Les marqueurs moléculaires de la résistance aux
79 médicaments sont donc extrêmement utiles pour identifier et surveiller les parasites *P. falciparum*

80 résistants aux médicaments et ont été décrits pour la plupart des médicaments antipaludiques. Des
81 mutations dans le gène de résistance aux médicaments multiples (*pfmdr1*), par exemple, ont été
82 associées à diverses réponses des parasites à la luméfántrine, à la chloroquine (CQ), à l'amodiaquine, à
83 la méfloquine et à la pipéraqúine. La base génétique de la résistance à la SP est bien documentée et
84 implique une accumulation de mutations dans le gène de la dihydrofolate-réductase (*pf_{dhfr}*) (N51I,
85 C59R, S108N et I164L) et dans le gène de la dihydroptéroate-synthase (*pf_{dhps}*) (S436A/F, A437G,
86 K540E, A581G et A613S/T). Les infections hébergeant le triple mutant *dhfr* **CIRNI** (mutations
87 soulignées) sont courantes dans toute l'Afrique et sont résistantes à la pyriméthamine [4], [5]. [4], [5].
88 La combinaison de ce triple mutant *dhfr* avec le double mutant *dhps* (A437G et K540E, **SGEAA**)
89 augmente encore le risque d'échec du traitement par SP à 50 % [5], [6].

90

91 Des mutations du gène *pfkelch13* associées à une sensibilité réduite à l'artémisinine sont apparues et se
92 sont répandues en Asie du Sud-Est et sont apparues plus récemment dans plusieurs pays d'Afrique de
93 l'Est [7]-[9]. On s'attend à ce que ce phénomène s'étende à d'autres régions d'Afrique et il est donc
94 essentiel de surveiller en permanence les variations génétiques de *pfkelch13*. La forte prévalence de la
95 résistance à la CQ a conduit à son retrait de toutes les directives de traitement des infections à *P.*
96 *falciparum* en Afrique subsaharienne. Des décennies plus tard, des parasites *P. falciparum* sensibles à
97 la CQ sont réapparus dans de nombreuses régions du monde [10]-[13]. C'est pourquoi il a été proposé
98 de réintroduire la CQ, en association avec d'autres antipaludiques [14]. Les rapports du Mali n'ont pas
99 observé de diminution substantielle de la fréquence des mutations du transporteur de la résistance à la
100 chloroquine (*pf_{prt}*) associées à la résistance à la CQ [15], bien qu'une tendance à la baisse ait été
101 récemment signalée dans des isolats maliens collectés en 2016-2017 [16]. Il est donc important de
102 poursuivre l'évaluation afin de déterminer si la CQ pourrait être réintroduite dans la région à l'avenir.

103

104 La majorité des infections paludéennes dans les zones endémiques sont asymptomatiques [17].
105 Cependant, ces porteurs ont tendance à être sous-représentés dans les analyses génomiques à grande
106 échelle, en raison à la fois de l'absence de recherche de traitement et des difficultés techniques liées au
107 séquençage des infections à faible densité. Les porteurs asymptomatiques sont les principaux

108 contributeurs au réservoir infectieux, car ils peuvent rester infectieux pendant de longues périodes sans
109 présenter de symptômes, ce qui signifie qu'ils peuvent transmettre la maladie à d'autres sans savoir qu'ils
110 sont infectés. En outre, leur fréquence dans la population et les caractéristiques des individus qui sont
111 plus susceptibles d'être asymptomatiques, comme un risque plus élevé de piqûres de moustiques,
112 augmentent encore leur contribution au réservoir infectieux [18], [19]. Il est donc essentiel de
113 comprendre les caractéristiques génétiques du réservoir asymptomatique pour contrôler efficacement la
114 propagation du paludisme.

115

116 Les progrès des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont rendu le séquençage du
117 génome entier (WGS) plus accessible et plus abordable pour la gestion des maladies et la lutte contre
118 le paludisme. Outre l'identification et le suivi des marqueurs moléculaires de la résistance aux
119 médicaments, l'étude des variations génomiques est utile pour comprendre la dynamique de la
120 transmission, les balayages sélectifs et l'épidémiologie de *P. falciparum*. L'évaluation des changements
121 dans la parenté génomique au sein d'une population, y compris en utilisant des mesures d'identité par
122 descendance, peut donner des indications sur la démographie de la population parasitaire et l'intensité
123 de la transmission au fil du temps [20]. En outre, l'identification des gènes soumis à une sélection peut
124 donner des indications sur la pression sélective exercée par les médicaments ou d'autres agents
125 inconnus, ce qui est important pour élaborer des stratégies efficaces de prévention, de contrôle et de
126 traitement du paludisme.

127

128 En résumé, la surveillance de la résistance aux médicaments de *P. falciparum* est essentielle pour
129 informer les politiques pharmaceutiques dans le monde entier, en particulier dans les régions à forte
130 transmission du paludisme, et l'OMS recommande une mise à jour et une surveillance régulière de la
131 résistance aux médicaments antipaludiques pour soutenir les progrès accomplis dans la lutte contre le
132 paludisme et son élimination. [21] . Dans ce rapport, nous fournissons une analyse approfondie des
133 profils de résistance aux médicaments et des variations génomiques récentes, en utilisant la sélection,
134 l'ascendance et l'analyse de l'identité par descendance, chez les personnes asymptomatiques à
135 Ouélessébougou et dans les villages voisins, au Mali, en 2019 et 2020. En outre, nous les plaçons dans

136 le contexte des isolats maliens de *P. falciparum* collectés entre 2007 et 2017, ainsi que des populations
137 parasitaires à l'échelle de l'Afrique.

138

139 **RÉSULTATS**

140 ***Structure génomique des populations maliennes de P. falciparum***

141 L'analyse SNP à l'échelle du génome de 962 isolats maliens de *P. falciparum*, collectés entre 2007 et
142 2020 dans deux études différentes et provenant de 9 endroits (**figure 1A**), a révélé des différences dans
143 la multiplicité de l'infection et la structure de la population. Les isolats de Ouélessébougou collectés en
144 2019-2020 provenaient d'infections asymptomatiques à *P. falciparum*, tandis qu'aucun détail sur la
145 présentation clinique n'était disponible pour les génomes disponibles publiquement dans la base de
146 données MalariaGEN. Les taux d'incidence de *P. falciparum* ont varié d'un site d'échantillonnage à
147 l'autre et sur deux décennies (**figure 1A-B**). Au total, 863 046 SNP de haute qualité ont été identifiés.
148 La multiclonalité a été mesurée à l'aide de la métrique F_{ws} , ou coefficient de consanguinité, qui indique
149 une monoclonalité si elle est $> 0,95$, tandis qu'une métrique F_{ws} plus faible indique une multiclonalité.
150 La valeur moyenne de F_{ws} pour les échantillons du Mali 2019-2020 ($n=87$) provenant de
151 Ouélessébougou était de 0,80, avec seulement 20% des échantillons abritant un seul clone. Nous avons
152 constaté une multiclonalité élevée dans les isolats de Ouélessébougou 2019-2020 par rapport aux isolats
153 provenant de différents sites où la collecte a eu lieu entre 2015 et 2017 (**figure 1C**). En utilisant les
154 données SNP, une analyse statistique UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) pour
155 regrouper les isolats, a révélé peu de sous-structure spatiale entre les populations, bien qu'un certain
156 regroupement basé sur le lieu (**Figure 1D**) et l'année de collecte (**Figure 1E**) puisse être observé et que
157 les isolats de Ouélessébougou forment un sous-groupe individuel.

158

159 ***Structure génomique des populations maliennes de P. falciparum par rapport aux*** 160 ***populations africaines***

161 Une visualisation UMAP basée sur les SNP et un arbre du maximum de vraisemblance montrent
162 comment les isolats de Ouélessébougou les plus récemment collectés sont apparentés aux populations
163 africaines ($n=875$) et ont révélé une similarité avec les isolats d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique centrale

164 (**figure 2A-B**). Aucun groupe distinct ne peut être détecté, ce qui indique une forte parenté et suggère
165 des mouvements d'informations génétiques au sein de ces populations, qui peuvent se produire à la fois
166 par le biais de la migration humaine et de la migration des vecteurs. Les isolats d'Afrique de l'Est,
167 d'Afrique du Sud-Est et d'Afrique centrale forment des groupes distincts, tandis que la Corne de
168 l'Afrique semble constituer un groupe distinct au sein de la population d'Afrique de l'Est. L'évaluation
169 de la multiclonalité montre que les isolats maliens de 2019-2020 sont relativement plus multiclonaux
170 que les isolats collectés dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest (**figure 2C**).

171

172 *Fréquences des marqueurs moléculaires de résistance aux médicaments*

173 Des fréquences accrues des marqueurs moléculaires de la sulfadoxine-pyriméthamine et la persistance
174 des marqueurs de résistance à la chloroquine ont été observées dans la population de Ouélessébougou
175 2019-2020 (n=87), par rapport aux isolats maliens de 2007-2017 (n=876) (**Tableau ST1**). Les
176 polymorphismes provoquant des changements d'acides aminés qui confèrent une résistance à la
177 chloroquine dans le *pfprt* (K76T, A220S, Q271E, N326S, I356T et R371I) ont persisté à des fréquences
178 similaires au fil du temps (**Figure 3A-B**). Le polymorphisme N86Y sur *pfmdr1* a diminué au fil du
179 temps, passant de 28,4 % en 2007 à 2,6 % en 2020. Cet allèle 86Y a été associé à la résistance à la
180 chloroquine et à l'amodiaquine ainsi qu'à la résistance à la pipéraquline (allèle 86Y en combinaison avec
181 Y184F), tandis que les parasites porteurs de l'allèle N86 sont moins sensibles à la luméfantine, à la
182 pipéraquline et à la méfloquine [22], [23]. Les modifications des acides aminés Y184F et D1246Y dans
183 le MDR1 ont persisté à des fréquences comparables. Trois SNP non synonymes dans *pfmdr1* qui
184 n'avaient pas été trouvés auparavant dans les isolats maliens, entraînant des changements d'acides
185 aminés S400C, D431Y et K503N, ont été identifiés dans 2,13% des isolats de 2019 et 2,94% des isolats
186 de 2020, respectivement (**tableau ST1**). La fréquence des mutations ponctuelles du *pfdhfr* associées à
187 la résistance à la pyriméthamine (N51I, C59R et S108N) a approximativement doublé depuis 2007,
188 atteignant des fréquences alarmantes de 92,4 %, 93,9 % et 92,7 %, respectivement, en 2020. En outre,
189 l'haplotype **CIRNI** triple mutant a augmenté en fréquence et représentait 82,7 % de la population de
190 parasites en 2019-2020, tandis que l'haplotype de type sauvage était réduit à 4,9 % (**figure 3C, tableau**
191 **ST2**). Une mutation du *pfdhps* conférant une résistance à la sulfadoxine (A437G) a vu sa fréquence

192 augmenter de 27,7 % en 2007 à 74,3 % en 2020, tandis que S436A a montré une tendance à la baisse
193 (**figure 3D**). La mutation *pf dhps* K540E a été trouvée dans 4 isolats en 2019-2020 et toutes ces
194 mutations ont été combinées avec le triple mutant *dhfr* du **CIRNI**, conduisant à une fréquence de mutant
195 quadruple de 2,47%. Un SNP non synonyme en position 748145 dans *pf dhfr* (V20I), a été nouvellement
196 identifié dans les isolats maliens en 2019, à une fréquence de 2,04%. Aucune mutation connue de
197 *pf kelch13* associée à la résistance à l'artémisinine n'a été identifiée dans les isolats maliens. Les
198 mutations R255K, K189N et K189T de *pf kelch13* ont persisté à des fréquences similaires à celles
199 observées en 2007 et aucune nouvelle mutation de *pf kelch13* n'a été identifiée (**tableau ST1**).

200

201 **Régions soumises à une pression sélective dans les isolats maliens**

202 La détermination des régions génomiques soumises à une sélection directionnelle par l'analyse de la
203 structure des haplotypes dans les isolats de Ouélessébougou 2019-2020 et en comparaison avec les
204 populations maliennes plus anciennes, a révélé qu'un certain nombre de gènes étaient soumis à une
205 pression sélective. Le score d'haplotype intégré (*iHS*) a été utilisé pour identifier les SNP sous sélection
206 dans la population 2019-2020 (**Figure 4A**) et les régions du génome avec un nombre élevé de SNP sous
207 sélection (**Tableau ST3**). Cela a permis d'identifier des gènes codant pour des protéines conservées de
208 *Plasmodium* dont la fonction est inconnue (PF3D7_0212100 et PF3D7_0425100), principalement
209 exprimés dans les ookinètes et les stades annulaires, respectivement, ainsi que le gène *pf CelTOS*, qui
210 code pour une protéine de traversée des cellules pour les ookinètes et les sporozoïtes et qui a été suggéré
211 comme un antigène candidat intéressant pour les vaccins [24], [25]. L'indice *Rsb* entre les populations
212 a été utilisé pour identifier les SNP en cours de sélection lors de la comparaison de la population 2019-
213 2020 avec les isolats maliens plus anciens collectés en 2007-2014 (n=414) (**Figure 4B**) et 2015-2017
214 (n=462) (**Figure 4C**). Les régions présentant un nombre élevé de SNP sous sélection ont également été
215 déterminées (**tableau ST4**). Cela a permis d'identifier des gènes associés à l'invasion des érythrocytes
216 (*pf db lmsp2*, *pf msp3*), au transport des protéines (*pf MC-2TM*), à la cytoadhérence (*pf CLAG3.2*), ainsi
217 qu'un gène codant pour un ARN de fonction inconnue (Pf3D7_0421400, RUF6).

218

219 *L'analyse des mélanges ancestraux confirme que les isolats maliens ont des ancêtres*
220 *similaires*

221 L'estimation de l'ascendance spatiale des isolats maliens et des populations africaines a révélé des
222 origines ancestrales similaires pour tous les isolats maliens de *P. falciparum*. Le nombre optimal de
223 populations ancestrales a été estimé à 5 (K=5 ; K1-K5), sur la base de la décroissance des valeurs
224 propres correspondant à K allant de 1 à 10. La population ancestrale K1 était dominante dans les
225 échantillons gambiens (49,4 %), tandis que la population ancestrale K2 semblait être liée aux
226 populations du Centre-Sud et de l'Afrique de l'Est (Malawi, 92,3 % ; Madagascar, 74,4 % ; Tanzanie,
227 69 % ; Kenya, 61,9 %). Les isolats maliens, ainsi que les isolats mauritaniens, semblaient contenir
228 principalement la population ancestrale K3 (Mali, 80,3 % ; Mauritanie, 80,5 %), ainsi que de plus petites
229 portions d'ascendance K2 (Mali, 8,5 % ; Mauritanie, 7,7 %) et K4 (Mali, 10 % ; Mauritanie, 10,1 %).
230 De très faibles fractions d'ascendance K1 et K5 étaient présentes dans les isolats maliens et
231 mauritaniens, à l'exception des isolats de Bandiagara au Mali qui ne semblaient pas contenir
232 d'ascendance K5 (**Figure 5**).

233

234 *L'analyse de l'identité par descendance révèle la grande diversité de la population de*
235 *Ouélessébougou*

236 En tant que mesure de la parenté génétique au sein des populations, l'analyse de l'identité par
237 descendance (IBD) a révélé que les isolats de Ouélessébougou présentent de très faibles fractions d'IBD
238 par paire à travers le génome (médiane = 0, intervalle = 0 - 0,133), tandis que les isolats maliens
239 collectés en 2007-2014 et 2015-2017 ont montré une parenté légèrement plus élevée (médiane = 0,021
240 et médiane = 0,017, respectivement) (**Figure S2**). Les 5 % de positions IBD les plus élevées (classées
241 dans des fenêtres de 10 kb du génome) dans les isolats de Ouélessébougou étaient réparties dans 17
242 régions sur 3 chromosomes (chr. 6, 7 et 13) (**Figure S3, Tableau ST5**). Trois régions à forte IBD sur
243 le chromosome 6 incluaient le gène codant pour l'histone méthyltransférase SET1 et le gène *pfert* sur le
244 chromosome 7 a également été identifié comme englobant une forte IBD.

245

246 **DISCUSSION**

247 Les technologies NGS ont fourni une méthode de plus en plus réalisable pour explorer la variation
248 génomique à l'échelle du génome et la dynamique des populations de parasites du paludisme. Ici, nous
249 avons fourni une analyse détaillée de la diversité génomique des isolats de *P. falciparum* provenant de
250 porteurs de gamétocytes asymptomatiques dans 11 villages de Ouélessébougou en 2019 et 2020 et les
251 avons placés dans le contexte d'isolats maliens précédemment séquencés, ainsi que d'isolats à l'échelle
252 africaine via une analyse SNP à l'échelle du génome. Nous avons constaté une forte multiclonalité et
253 une faible parenté entre les isolats et identifié des gènes soumis à une pression sélective. Nous avons
254 également observé des fréquences accrues de marqueurs moléculaires de résistance à la sulfadoxine-
255 pyriméthamine et à la luméfantrine, par rapport aux isolats maliens plus anciens.

256

257 Les génomes des isolats maliens de *P. falciparum* collectés entre 2007 et 2017 ont été générés
258 précédemment [16], [26]. Cependant, une stratégie d'échantillonnage plus actualisée et plus
259 systématique est nécessaire pour soutenir les efforts de contrôle et d'élimination de l'infection. .
260 Ouélessébougou est une communauté rurale de la région de Koulikoro, dans le sud-ouest du Mali, qui
261 présente l'un des taux d'incidence de *P. falciparum* les plus élevés du pays [27]. Idéalement, dans de
262 tels contextes, il devrait y avoir un suivi régulier des changements dans la variation génomique, afin de
263 déterminer les schémas épidémiologiques et la dynamique de la population, en particulier parmi les
264 porteurs asymptomatiques de gamétocytes, et d'évaluer l'impact des mesures de contrôle de l'infection.
265 Par exemple, une surveillance continue des marqueurs moléculaires de la résistance aux médicaments
266 est nécessaire pour informer les approches de la chimiothérapie du paludisme.

267

268 Les isolats maliens présentent un regroupement mineur en utilisant la visualisation UMAP, les isolats
269 de Ouélessébougou formant un sous-groupe. Sur un arbre de maximum de vraisemblance, les isolats de
270 Ouélessébougou et d'autres isolats maliens se regroupent avec les populations d'Afrique de l'Ouest,
271 comme prévu. Malgré un rapport récent observant une diminution de la multiplicité de l'infection de
272 2007 à 2017 au Mali [16], nos résultats montrent une multiclonalité plus élevée en 2019-2020 que dans

273 les isolats provenant de différents sites où la collecte a eu lieu entre 2015 et 2017. Le statut hautement
274 multiclonal de la population parasitaire étudiée peut s'expliquer par de multiples facteurs, tels que les
275 taux d'incidence élevés de *P. falciparum* dans cette région (Fig. 1B), le moment de la collecte des
276 échantillons pendant la saison de transmission maximale (septembre-décembre) et la présentation
277 clinique asymptomatique des individus. Comme les porteurs asymptomatiques de gamétocytes de *P.*
278 *falciparum* sont moins susceptibles de chercher un traitement, ces infections peuvent se prolonger, ce
279 qui augmente la probabilité de réinfection et de multiclonalité. Bien que la plupart des données de
280 séquençage disponibles proviennent d'infections incidentes, il est important de caractériser
281 génétiquement les porteurs asymptomatiques de *P. falciparum*, car ce sont eux qui contribuent le plus
282 au réservoir infectieux et qui sont à l'origine des infections qui échappent au traitement [18].

283

284 Les stratégies de traitement du paludisme dans le monde ont été modifiées au fil du temps en raison de
285 l'émergence de parasites résistants aux anciens médicaments de première intention, dans le but de
286 préserver l'efficacité des médicaments antipaludiques et de réduire le fardeau mondial du paludisme.
287 Nous avons constaté que les fréquences des marqueurs moléculaires conférant une résistance à la CQ
288 ont persisté dans les isolats maliens 2019-2020 à des fréquences similaires à celles d'il y a dix ans,
289 malgré son retrait de toutes les directives de traitement de *P. falciparum* depuis 2006 et un rapport
290 faisant état d'une tendance à la baisse en 2017 au Mali [16]. Cette situation est différente de celle d'autres
291 régions du monde où un retour de la sensibilité à la CQ a été observé [11]-[14], [28] et pourrait indiquer
292 un faible coût d'adaptation associé au maintien des polymorphismes de résistance au *pfcr*t dans la
293 population ou une utilisation continue de la CQ en vente libre. [29]-[31], soulignant ainsi la nécessité
294 d'étudier et de réduire la disponibilité de ce médicament au Mali.

295

296 Nous avons observé une augmentation de la variante N86 *pfmdr1* de 71,6 % en 2007 à 97,4 % en 2020.
297 Cet allèle N86 a été associé à une moindre sensibilité à la luméfántrine, à la pipéraqúine et à la
298 méfloqúine [22], [23], tandis que l'allèle 86Y a précédemment montré une résistance à la chloroqúine
299 et à l'amodiaqúine, ainsi qu'à la pipéraqúine. 86Y a précédemment montré une résistance à la
300 chloroqúine et à l'amodiaqúine, ainsi qu'une résistance à la pipéraqúine (allèle 86Y en combinaison

301 avec Y184F). Par conséquent, il a été constaté que l'AL sélectionnait l'allèle N86, tandis que
302 l'artésunate-amodiaquine et la dihydroartémisinine-pipéraquine sélectionnent l'allèle 86Y. [32]-[35] .
303 Le génotypage N86Y pourrait donc être un marqueur utile pour guider la rotation des CTA dans une
304 zone géographique donnée [36]. Ainsi, l'augmentation observée de l'allèle N86 peut refléter une
305 proportion croissante d'isolats présentant une sensibilité réduite à l'AL, ce qui soulève des inquiétudes
306 quant à l'utilisation continue de l'AL en tant que CTA de première ligne au Mali. Une faible fréquence
307 de l'allèle 86Y a déjà été rapportée au Mali en 2016, ainsi que dans d'autres pays africains où l'AL est
308 largement utilisée [15], [34]. Ce résultat contraste avec l'augmentation de la fréquence de l'allèle 86Y
309 observée précédemment chez les enfants de Ouélessébougou entre 2014 et 2016, après 3 ans de CPS
310 avec SPAQ, qui était probablement due à la sélection de l'allèle 86Y par l'amodiaquine [37]. Cependant,
311 il est important de noter que, bien qu'une diminution de la sensibilité à l'AL des isolats porteurs de
312 l'allèle N86 ait été observée dans des isolats provenant de plusieurs pays africains [22], [32], [33] .

313

314 Des fréquences élevées de mutants CIRNI triple *pf_{dhfr}* (82,72 %) ont été observées dans les isolats de
315 Ouélessébougou de 2019-2020, ce qui représente une augmentation substantielle par rapport aux années
316 précédentes (34,3 %, 55,1 % et 70,7 % en 2007, 2013-2014 et 2015-2017, respectivement). Le mutant
317 *pf_{dhps}* K540E, qui était quasi absent dans les isolats maliens collectés entre 2007 et 2017, a été retrouvé
318 dans 5,9% des isolats de 2019 et 2,7% des isolats de 2020. En outre, tous les isolats mutants K540E
319 portaient le triple mutant *dhfr*. Une surveillance continue est donc nécessaire pour contrôler les niveaux
320 de résistance à la SP et l'émergence de mutants quadruple et quintuple (en combinaison avec *dhps*
321 A437G ou *dhps* A581G). En outre, les cartes de prévalence des mutations en ligne telles que [wwarn.org](http://www.who.int/wwarn)
322 SP molecular surveyor deviendront de plus en plus utiles pour évaluer le médicament à utiliser pour la
323 CPS [38]. Aucun SNP à des positions du gène *pfkelch13* qui ont été signalées comme entraînant une
324 diminution de la sensibilité aux dérivés de l'artémisinine n'a été observé dans les isolats maliens.
325 Cependant, il est nécessaire de poursuivre la surveillance des mutants *pfkelch13* au cours des prochaines
326 années, car on peut s'attendre à une propagation de ces allèles à partir de l'Afrique de l'Est ou à leur
327 émergence indépendante.

328

329 L'analyse de la structure des haplotypes dans les isolats de Ouélessébougou de 2019-2020 a identifié
330 des SNP soumis à une pression sélective dans le gène *pfCelTOS*, qui est impliqué dans la motilité de
331 glissement des sporozoïtes, la traversée des cellules, et qui est un candidat vaccinal bloquant la
332 transmission [24], [25]. Une pression sélective a été observée à cet emplacement génomique avant le
333 début de l'épidémie de la grippe aviaire. La pression sélective a déjà été observée à cet emplacement
334 génomique [39], ce qui indique un degré élevé de diversité et fait de *pfCelTOS* un candidat-vaccin moins
335 intéressant. Une analyse croisée des populations comparant les populations de parasites de 2019-2020
336 à celles de 2007-2014 et 2015-2017 a été réalisée et, malgré l'augmentation des fréquences des
337 marqueurs moléculaires de la résistance aux médicaments au cours de cette période de 13 ans, nous
338 n'avons trouvé aucun SNP associé à la résistance aux médicaments soumis à une pression sélective
339 directionnelle. Nous avons identifié des SNP soumis à une pression sélective dans des gènes associés à
340 l'invasion des érythrocytes (*pfdblmsp2*) dans les deux comparaisons de populations et des gènes associés
341 au transport des protéines (*pfMC-2TM*), à la cytoadhérence (*pfCLAG3.2*) et à un gène codant pour un
342 ARN de fonction inconnue (Pf3D7_0421400, RUF6) dans la comparaison entre les populations de
343 2019-2020 et de 2015-2017. La pression sélective dans *pfdblmsp2* et les membres de la famille
344 multigénique *clag* a déjà été décrite et est probablement due à leur emplacement en tant que protéines
345 de surface et au contact avec le système immunitaire de l'hôte qui en résulte [39], [40]. L'analyse IBD
346 a révélé de très faibles fractions d'IBD par paire à travers le génome dans les isolats de Ouélessébougou
347 2019-2020, ce qui indique une faible parenté entre les isolats. Le gène *pfCRT*, associé à la résistance à la
348 CQ et à la pipéraquline, se trouvait dans les 5 % de positions IBD les plus élevées, ce qui suggère que
349 ce gène est très conservé parmi les isolats de Ouélessébougou. Ceci est en accord avec les fréquences
350 persistantes observées des marqueurs moléculaires de la résistance à la CQ. En outre, le gène *pfSET1*,
351 une histone lysine méthyltransférase d'importation, était également très conservé. L'analyse de
352 l'ascendance du mélange a montré des ascendances similaires pour tous les isolats maliens, ce qui est
353 en accord avec un rapport récent [16].
354
355 Cette étude présente plusieurs limites. Tout d'abord, un biais d'échantillonnage ne peut être exclu car
356 nous n'avons séquencé que des parasites provenant d'infections asymptomatiques et d'individus âgés de

357 5 à 50 ans, alors que les ensembles de données accessibles au public ne précisent pas la présentation
358 clinique ou l'âge de l'individu. En outre, l'analyse du nombre de copies de la *plasmepsine 1-2*, qui
359 confère la résistance à la pipéraquline, n'a pas été réalisée, en raison de l'amplification sélective du
360 génome entier (sWGA) de l'ADN du parasite avant le séquençage, qui empêche une analyse adéquate
361 du nombre de copies. Enfin, nous n'avons pas évalué la résistance phénotypique ou toute association
362 entre le génotype et le phénotype, mais les marqueurs moléculaires de la résistance aux médicaments
363 rapportés ici ont été largement prouvés pour prédire les niveaux de résistance aux médicaments *in vitro*
364 ou les résultats du traitement des patients [4]-[6], [41]-[43].

365

366 Après des années de progrès dans la réduction de la charge mondiale du paludisme, les taux d'incidence
367 et les décès sont maintenant en hausse. Cette augmentation pourrait être due aux perturbations des
368 programmes de lutte contre le paludisme pendant la pandémie de COVID-19, mais la résistance aux
369 antipaludiques a également été liée à cette augmentation. Pour progresser vers l'objectif de réduire de
370 90 % le fardeau du paludisme dans le monde d'ici à 2030 [44], il est nécessaire de mettre en place des
371 programmes de lutte contre le paludisme. Nous devons obtenir une image complète de la variation
372 génomique et de l'épidémiologie des populations de parasites. Ici, nous avons fourni une évaluation
373 actualisée de la diversité génomique de la population de parasites *P. falciparum* dans le sud-ouest du
374 Mali, une région où la transmission du paludisme est très intense. Nos résultats montrent que les
375 parasites originaires du Mali sont regroupés en fonction de leur origine géographique et temporelle, les
376 isolats de Ouélessébougou formant un sous-groupe distinct. Ceci suggère une grande diversité
377 génétique parmi les isolats maliens. Les marqueurs moléculaires de la résistance à la SP sont en
378 augmentation, ce qui montre une progression vers l'échec de cette association médicamenteuse et
379 nécessite une surveillance continue. Aucune diminution de la résistance à la CQ n'a été observée au fil
380 du temps, ce qui s'oppose à l'idée d'une réintroduction potentielle de la CQ au Mali dans un avenir
381 proche. Notre étude fournit des données précieuses sur le scénario épidémiologique actuel et la
382 résistance aux médicaments du paludisme au Mali et peut contribuer à un contrôle efficace du paludisme
383 au Mali. D'autres applications des approches de séquençage, y compris les nouvelles technologies

384 portables et les tests de séquençage d'amplicons, dans les pays où le paludisme est endémique sont
385 nécessaires pour aider au contrôle de la maladie et informer les directives de traitement.

386

387 **MÉTHODES**

388 **Sites d'étude**

389 En 2019 et 2020, un total de 180 personnes présentant des gamétocytes de *P. falciparum* détectables au
390 microscope en l'absence de symptômes de paludisme ont été recrutées dans le cadre de deux essais
391 cliniques [45], [46] à Ouélessébougou et dans 11 villages de Ouélessébougou, au Mali (**Figure S1**).
392 Ouélessébougou est une commune qui comprend la ville de Ouélessébougou et 44 villages
393 environnants, soit un total d'environ 50 000 habitants. La ville est située à environ 80 km au sud de
394 Bamako, la capitale du Mali. La transmission du paludisme à Ouélessébougou est très saisonnière et se
395 produit pendant la saison des pluies, de juillet à novembre. Les données WGS publiquement disponibles
396 sur les isolats maliens proviennent de huit autres sites du sud du Mali, essentiellement des villages
397 ruraux (Bougoula-Hameau, Dangassa, Faladje, Kenieroba, Kolle, Nioro-du-Sahel, Bandiagara) et d'une
398 zone urbaine (Bamako). Tous les sites ont un climat subtropical avec des saisons sèches et pluvieuses,
399 à l'exception de Nioro-du-Sahel, qui est caractérisé par un climat désertique [2], [16].

400

401 **Collecte d'échantillons et séquençage du génome entier**

402 Au total, 97 échantillons de sang total ont été prélevés sur des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*,
403 âgés de 5 à 50 ans, recrutés dans le cadre de deux essais cliniques précédemment publiés à
404 Ouélessébougou [45], [46]. L'autorisation de mener cette étude a été obtenue auprès du Comité d'éthique
405 de la recherche de la London School of Hygiene and Tropical Medicine (numéros de référence 17507
406 et 21905) et du Comité d'éthique de l'Université des Sciences Techniques et Technologies de Bamako
407 (numéros de référence 2019/67/CE/FMPOS et 2020/96/CE/FMPOS/FAPH) et a été réalisée
408 conformément aux directives et réglementations en vigueur. Les essais ont été enregistrés sur
409 ClinicalTrials.gov (NCT04049916 et NCT04609098). Le consentement éclairé écrit de tous les sujets
410 et/ou de leurs tuteurs légaux a été obtenu avant le prélèvement des échantillons. Pour les participants

411 mineurs, le consentement éclairé pour la participation à l'étude a été obtenu de leurs parents et/ou de
412 leur tuteur légal. L'identification des espèces a été effectuée au microscope par des microscopistes
413 formés au Centre de recherche et de formation sur le paludisme de l'Université de Bamako (Bamako,
414 Mali). L'ADN a été extrait de 83,3 µL de sang total à l'aide d'un extracteur automatisé MagNAPure LC
415 (Total Nucleic Acid Isolation Kit High Performance ; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)
416 et amplifié à l'aide d'un ensemble d'amorces et d'un protocole d'amplification sélective du génome entier
417 (sWGA) établis. [47], [48]. Le séquençage du génome entier a été réalisé sur une plateforme Illumina
418 Novaseq 6000 chez Eurofins Genomics, en Allemagne, ce qui a permis d'obtenir un minimum de 3,75
419 millions de lectures appariées (lectures de 250 pb) par échantillon.

420

421 **Sélection des ensembles de données, cartographie des lectures, détection des variantes et contrôle** 422 **de la qualité**

423 Au total, 1701 isolats de *P. falciparum* ont été inclus dans l'analyse (**fichier supplémentaire S1**), y
424 compris des séquences de génomes entiers accessibles au public Malaria Genetic Epidemiology
425 Network [26] (MalariaGEN) (Pf Community Project, n = 1141 ; SPOTmalaria project, n = 463) et des
426 isolats nouvellement séquencés (n = 97) provenant de personnes asymptomatiques infectées par *P.*
427 *falciparum* et recrutées dans le cadre de deux essais cliniques précédemment publiés à Ouélessébougou,
428 au Mali [45], [46]. Toutes les données brutes ont été filtrées à l'aide de *trimmomatic* (version 0.39) et
429 des paramètres suivants : LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36. Les
430 lectures Illumina ont ensuite été mises en correspondance avec le génome de référence de *P. falciparum*
431 (Pf3D7 ; v3) à l'aide du logiciel *bwa-mem* (v0.7.17). Les SNP et les insertions et délétions courtes ont
432 été appelés à l'aide des logiciels *samtools* (v1.12) et GATK (v4.1.4.1). Les SNP à appel mixte ont été
433 assignés à des génotypes déterminés par un ratio de couverture dans lequel les appels de nucléotides
434 étaient de 80 % ou plus. Les échantillons présentant plus de 40 % de lacunes n'ont été inclus dans aucune
435 analyse. Sur les 97 échantillons nouvellement séquencés, 9 ont été retirés en raison de l'absence de
436 réponse et un a été retiré après que la prédiction de l'espèce a identifié *P. malariae*
437 (<https://github.com/jodyphelan/malaria-profiler>), laissant un total de 87 (89,6 %) isolats nouvellement
438 séquencés dans les analyses finales. Parmi les ensembles de données accessibles au public, 8 ont été

439 supprimés, ce qui a donné un total de 1673 échantillons inclus dans les analyses, y compris des isolats
440 du Cameroun (n = 99), de la République démocratique du Congo (RDC ; n = 98), de la Gambie (n =
441 80), du Kenya (n = 91), du Malawi (n = 97), du Mali (n = 962), de la Mauritanie (n = 79), de la Tanzanie
442 (n = 120), de Madagascar (n = 22) et de l'Éthiopie (n = 25).

443

444 **Analyses génétiques des populations**

445 La visualisation de la géographie des sites d'échantillonnage a été réalisée à l'aide des logiciels R *ggmap*
446 (version 3.0.0) et *tmap* (version 3.3.3). Les taux d'incidence de *P. falciparum* pour la période 2000-
447 2020 ont été consultés sur le site du Malaria Atlas Project [27] . Les graphiques UMAP (Uniform
448 Manifold Approximation and Projection) ont été créés à l'aide du package R *uwot* avec la métrique
449 "hamming" et les paramètres par défaut. Un arbre de vraisemblance maximale a été créé en appliquant
450 le logiciel *iqtree* en utilisant les SNP du génome entier, et la visualisation a été effectuée dans *iTOL*
451 (version 6) [49], [50]. Pour les analyses génétiques des populations qui comparent les isolats maliens
452 aux populations africaines, un sous-ensemble d'isolats maliens collectés entre 2007 et 2017 a été utilisé
453 (y compris 10 isolats de chaque site et de chaque année de collecte, si disponible), afin d'obtenir un
454 nombre comparable d'isolats entre les populations. La multiclonalité a été déterminée en calculant la
455 métrique F_{ws} , à l'aide d'un script interne qui utilise le package R *moimix*
456 (<https://github.com/bahlolab/moimix>) pour évaluer la diversité intra-hôte par rapport à la diversité de la
457 population locale. Seuls les SNP bi-alléliques dans les régions codantes ont été utilisés pour les calculs
458 et un filtrage des fréquences des allèles mineurs (MAF) de 0,1 % a été effectué afin d'inclure
459 exclusivement les SNP robustes. Les MAF dans les gènes de résistance aux médicaments ont été extraits
460 de la matrice binaire et annotés à l'aide du logiciel *CSQ de Bcftools*, qui identifie la mutation comme
461 non synonyme, synonyme ou intergénique, ainsi que le décalage de codon et de protéine causé par toute
462 mutation non synonyme [51]. Seules les positions génomiques avec des MAF d'au moins 2 % ont été
463 retenues dans l'analyse. La visualisation des données a été réalisée à l'aide du progiciel R *ggplot2* (R
464 version 4.1.2). Les régions du génome soumises à une sélection directionnelle ont été identifiées à
465 l'aide du progiciel R *rehh* (version 3.2.2), qui utilise des mesures basées sur la population de la diversité
466 des haplotypes au sein des populations (*iHS*) ou entre les populations (*Rsb*) [52]. Le progiciel R *Tess3r*

467 (version 1.1.0, utilisant les paramètres par défaut à l'exception de "rep=25") a été utilisé pour calculer
468 le mélange sur la base de la modélisation spatiale du partage des allèles en utilisant les coordonnées
469 géographiques des sites d'échantillonnage en plus des données SNP pangénomiques [53]. Le nombre
470 optimal d'ascendances a été déterminé pour différents nombres de sous-populations ($K = 1, 2, \dots, 10$).
471 L'analyse IBD pour les isolats avec $F_{ws} > 0,85$ a été réalisée pour évaluer la connectivité entre les
472 parasites au sein des populations. Pour ce faire, on a estimé la fraction d'ascendance partagée par paire
473 entre les segments génomiques, dont on a déduit qu'ils descendaient d'un ancêtre commun récent. Ces
474 fractions IBD ont été calculées à l'aide du logiciel *hmmIBD* avec les paramètres par défaut, qui déploie
475 une approche basée sur un modèle de Markov caché [54].

476

477 **Remerciements**

478 Nous souhaitons remercier les participants à l'étude et le personnel du centre de santé communautaire
479 de Ouélessébougou et des villages environnants pour leur coopération, ainsi que le moniteur de sécurité
480 local et les membres du comité de surveillance des données et de la sécurité pour leur supervision. Nous
481 remercions le centre de ressources MalariaGEN pour la génération des données génétiques publiées.

482

483 **Déclaration de financement**

484 Cette analyse a été réalisée sur des génomes séquencés à partir d'échantillons de sang collectés dans le
485 cadre de deux essais cliniques au Mali, financés par la Fondation Bill & Melinda Gates (#INV-002098).
486 LNV bénéficie d'une bourse de doctorat du Biotechnology and Biological Sciences Research Council
487 (BBSRC) LSHTM-tethered PhD award. SC est financé par le Medical Research Council UK
488 (subvention n° MR/M01360X/1). TGC bénéficie du soutien du Medical Research Council UK
489 (subventions n° MR/M01360X/1, MR/N010469/1, MR/R020973/1, MR/X005895/1). Les financeurs
490 n'ont joué aucun rôle dans la conception de l'étude, la collecte et l'analyse des données, la décision de
491 publier ou la préparation du manuscrit.

492

493 **Contributions des auteurs**

494 A Dicko, WS, CD, MJS, TB et SC ont conçu et élaboré l'étude ; AM, SMN, KS, AY, A Dembele, MD,
495 SO et A Dicko ont coordonné et effectué le recrutement et la collecte des échantillons ; LNV a traité
496 les échantillons pour le séquençage. LNV, SC et CD ont coordonné le séquençage des échantillons ;
497 LNV, EM, JP, AO et AS ont effectué l'analyse bioinformatique et statistique, sous la supervision de SC
498 et TGC ; LNV a rédigé la première version du manuscrit, et la version finale a été révisée par tous les
499 auteurs. Le manuscrit final a été lu et approuvé par tous les auteurs.

500

501 **Intérêts concurrents**

502 Les auteurs ne déclarent aucun intérêt concurrent.

503

504 **Disponibilité des données**

505 Les ensembles de données présentés dans cette étude se trouvent dans les Archives européennes de
506 nucléotides (ENA). Les noms et les numéros d'accès des échantillons figurent dans le fichier
507 supplémentaire S1. Les séquences brutes des isolats séquencés dans cette étude sont disponibles sur le
508 site web de l'ENA (Project accession PRJEB60381).

509

510 RÉFÉRENCES

- 511 [1] Organisation mondiale de la santé, *Rapport sur le paludisme dans le monde 2022*.
 512 Genève : Organisation mondiale de la santé, 2022. Consulté : 18 déc. 2022. [En ligne].
 513 Disponible : [https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-](https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022)
 514 [malaria-report-2022](https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022)
- 515 [2] M. Cissoko *et al*, 'Geo-Epidemiology of Malaria at the Health Area Level, Dire Health
 516 District, Mali, 2013-2017', *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 17, no. 11, p. 3982,
 517 Jun. 2020, doi : 10.3390/ijerph17113982.
- 518 [3] M. Dhorda, C. Amaratunga, et A. M. Dondorp, 'Artemisinin and multidrug-resistant
 519 Plasmodium falciparum - a threat for malaria control and elimination', *Curr. Opin.*
 520 *Infect. Dis.*, vol. 34, no. 5, p. 432, Oct. 2021, doi : 10.1097/QCO.0000000000000766.
- 521 [4] W. Sirawaraporn, T. Sathitkul, R. Sirawaraporn, Y. Yuthavong et D. V. Santi,
 522 "Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase", *Proc.*
 523 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 4, pp. 1124-1129, Feb. 1997, doi :
 524 10.1073/pnas.94.4.1124.
- 525 [5] S. G. Staedke, H. Sendagire, S. Lamola, M. R. Kanya, G. Dorsey et P. J.
 526 Rosenthal, 'Relationship between age, molecular markers, and response to
 527 sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda', *Trop. Med. Int. Health*,
 528 vol. 9, no. 5, pp. 624-629, 2004, doi : 10.1111/j.1365-3156.2004.01239.x.
- 529 [6] J. G. Kublin *et al*, 'Molecular Markers for Failure of Sulfadoxine-Pyrimethamine and
 530 Chlorproguanil-Dapsone Treatment of Plasmodium falciparum Malaria', *J. Infect. Dis.*,
 531 vol. 185, no. 3, pp. 380-388, Feb. 2002, doi : 10.1086/338566.
- 532 [7] A. Uwimana *et al*, 'Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant
 533 Plasmodium falciparum kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda', *Nat. Med.*, vol.
 534 26, no. 10, pp. 1602-1608, Oct. 2020, doi : 10.1038/s41591-020-1005-2.
- 535 [8] B. Balikagala *et al*, 'Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa', *N. Engl. J.*
 536 *Med.*, vol. 385, no. 13, pp. 1163-1171, Sep. 2021, doi : 10.1056/NEJMoa2101746.
- 537 [9] B. H. Stokes *et al*, 'Plasmodium falciparum K13 mutations in Africa and Asia impact
 538 artemisinin resistance and parasite fitness', *eLife*, vol. 10, p. e66277, Jul. 2021, doi :
 539 10.7554/eLife.66277.
- 540 [10] A. E. P. Frosch *et al*, 'Return of Widespread Chloroquine-Sensitive Plasmodium
 541 falciparum to Malawi', *J. Infect. Dis.*, vol. 210, no. 7, pp. 1110-1114, oct. 2014, doi :
 542 10.1093/infdis/jiu216.
- 543 [11] K. K. Asare, J. Africa, J. Mbata, and Y. K. Opoku, 'The emergence of chloroquine-
 544 sensitive Plasmodium falciparum is influenced by selected communities in some parts
 545 of the Central Region of Ghana', *Malar. J.*, vol. 20, no. 1, p. 447, Nov. 2021, doi :
 546 10.1186/s12936-021-03985-8.
- 547 [12] O. Dagnogo *et al*, " Vers une réémergence de la sensibilité à la chloroquine en Côte
 548 d'Ivoire ? ", *Malar. J.*, vol. 17, no. 1, p. 413, nov. 2018, doi : 10.1186/s12936-018-2551-
 549 7.
- 550 [13] B. J. Njiro, R. F. Mutagonda, A. T. Chamani, T. Mwakyandile, D. Sabas, and G. M.
 551 Bwire, 'Molecular surveillance of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in sub-
 552 Saharan African countries after withdrawal of chloroquine for treatment of
 553 uncomplicated malaria : A systematic review', *J. Infect. Public Health*, vol. 15, no. 5,
 554 pp. 550-557, mai 2022, doi : 10.1016/j.jiph.2022.03.015.
- 555 [14] J. G. Kublin *et al*, 'Reemergence of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum
 556 malaria after cessation of chloroquine use in Malawi', *J. Infect. Dis.*, vol. 187, no. 12,
 557 pp. 1870-1875, Jun. 2003, doi : 10.1086/375419.

- 558 [15] S. A. S. Diakité *et al*, 'A comprehensive analysis of drug resistance molecular markers
559 and *Plasmodium falciparum* genetic diversity in two malaria endemic sites in Mali',
560 *Malar. J.*, vol. 18, no. 1, p. 361, nov. 2019, doi : 10.1186/s12936-019-2986-5.
- 561 [16] A. Coulibaly *et al*, 'Genome-wide SNP analysis of *Plasmodium falciparum* shows
562 differentiation at drug-resistance-associated loci among malaria transmission settings in
563 southern Mali', *Front. Genet*, vol. 13, p. 943445, Oct. 2022, doi :
564 10.3389/fgene.2022.943445.
- 565 [17] T. Bousema, L. Okell, I. Felger, and C. Drakeley, 'Asymptomatic malaria infections :
566 detectability, transmissibility and public health relevance', *Nat. Rev. Microbiol*, vol. 12,
567 no. 12, pp. 833-840, déc. 2014, doi : 10.1038/nrmicro3364.
- 568 [18] F. G. Tadesse *et al*, "The Relative Contribution of Symptomatic and Asymptomatic
569 *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Infections to the Infectious Reservoir in
570 a Low-Endemic Setting in Ethiopia" (La contribution relative des infections
571 symptomatiques et asymptomatiques à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum* au
572 réservoir infectieux dans un contexte de faible endémicité en Éthiopie), *Clin. Infect. Dis.*
573 *Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 66, no. 12, pp. 1883-1891, Jun. 2018, doi :
574 10.1093/cid/cix1123.
- 575 [19] B. P. Gonçalves *et al*, 'Examining the human infectious reservoir for *Plasmodium*
576 *falciparum* malaria in areas of differing transmission intensity', *Nat. Commun*, vol. 8, no.
577 1, p. 1133, déc. 2017, doi : 10.1038/s41467-017-01270-4.
- 578 [20] D. E. Neafsey, A. R. Taylor et B. L. MacInnis, "Advances and opportunities in malaria
579 population genomics", *Nat. Rev. Genet*, vol. 22, no. 8, Art. no. 8, août 2021, doi :
580 10.1038/s41576-021-00349-5.
- 581 [21] E. Patouillard, J. Griffin, S. Bhatt, A. Ghani et R. Cibulskis, " Global investment targets
582 for malaria control and elimination between 2016 and 2030 ", *BMJ Glob. Health*, vol. 2,
583 no. 2, p. e000176, mai 2017, doi : 10.1136/bmjgh-2016-000176.
- 584 [22] M. Malmberg *et al*, '*Plasmodium falciparum* drug resistance phenotype as assessed by
585 patient antimalarial drug levels and its association with *pfmdr1* polymorphisms', *J.*
586 *Infect. Dis.*, vol. 207, no. 5, pp. 842-847, mars 2013, doi : 10.1093/infdis/jis747.
- 587 [23] M. I. Veiga *et al*, 'Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium*
588 *falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies', *Nat. Commun.*,
589 vol. 7, no. 1, p. 11553, mai 2016, doi : 10.1038/ncomms11553.
- 590 [24] E. S. Bergmann-Leitner, P. M. Legler, T. Savranskaya, C. F. Ockenhouse, et E. Angov,
591 'Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection
592 against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS',
593 *Vaccine*, vol. 29, no. 35, pp. 5940-5949, août 2011, doi : 10.1016/j.vaccine.2011.06.053.
- 594 [25] E. S. Bergmann-Leitner *et al*, 'Self-adjuvanting bacterial vectors expressing pre-
595 erythrocytic antigens induce sterile protection against malaria', *Front. Immunol.*, vol. 4,
596 p. 176, 2013, doi : 10.3389/fimmu.2013.00176.
- 597 [26] MalariaGEN *et al*, 'Pf7 : an open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in
598 20,000 worldwide samples', *Wellcome Open Res*, vol. 8, p. 22, Jan. 2023, doi :
599 10.12688/wellcomeopenres.18681.1.
- 600 [27] D. A. Pfeffer *et al*, 'malariaAtlas : an R interface to global malariometric data hosted by
601 the Malaria Atlas Project', *Malar. J.*, vol. 17, no. 1, p. 352, oct. 2018, doi :
602 10.1186/s12936-018-2500-5.
- 603 [28] H. Ocholla *et al*, 'Whole-Genome Scans Provide Evidence of Adaptive Evolution in
604 Malawian *Plasmodium falciparum* Isolates', *J. Infect. Dis.*, vol. 210, no. 12, pp. 1991-
605 2000, Dec. 2014, doi : 10.1093/infdis/jiu349.
- 606 [29] A. E. Frosch, M. Venkatesan, et M. K. Laufer, 'Patterns of chloroquine use and
607 resistance in sub-Saharan Africa : a systematic review of household survey and

- 608 molecular data', *Malar. J.*, vol. 10, no. 1, p. 116, mai 2011, doi : 10.1186/1475-2875-10-
609 116.
- 610 [30] A. Paloyo et A. Reichert, "Biting Back at Malaria : Assessing Health-service Providers'
611 Compliance with Treatment Guidelines", *Rev. Dev. Econ.*, vol. 21, no. 3, pp. 591-626,
612 2017, doi : 10.1111/rode.12283.
- 613 [31] Office des Nations Unies contre la drogue et le crime, *Trafic de produits médicaux au*
614 *Sahel*. Nations Unies, 2023. doi : 10.18356/9789210025409.
- 615 [32] S. D. Otienoburu *et al*, 'Selection of Plasmodium falciparum pfcr1 and pfmdr1
616 polymorphisms after treatment with artesunate-amodiaquine fixed dose combination or
617 artemether-lumefantrine in Liberia', *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, p. 452, Sep. 2016, doi :
618 10.1186/s12936-016-1503-3.
- 619 [33] C. Sisowath *et al*, 'In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding
620 alleles by artemether-lumefantrine (Coartem)', *J. Infect. Dis.*, vol. 191, no. 6, pp. 1014-
621 1017, mars 2005, doi : 10.1086/427997.
- 622 [34] A. R. Taylor *et al*, 'Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine Exert
623 Inverse Selective Pressure on Plasmodium Falciparum Drug Sensitivity-Associated
624 Haplotypes in Uganda', *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 4, no. 1, p. ofw229, 2017, doi :
625 10.1093/ofid/ofw229.
- 626 [35] P. Sondo *et al*, 'Artesunate-Amodiaquine and Artemether-Lumefantrine Therapies and
627 Selection of Pfcr1 and Pfmdr1 Alleles in Nanoro, Burkina Faso', *PLoS ONE*, vol. 11, no.
628 3, p. e0151565, Mar. 2016, doi : 10.1371/journal.pone.0151565.
- 629 [36] J. P. Gil et S. Krishna, " pfmdr1 (Plasmodium falciparum multidrug drug resistance
630 gene 1) : a pivotal factor in malaria resistance to artemisinin combination therapies ",
631 *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 15, no. 6, pp. 527-543, Jun. 2017, doi :
632 10.1080/14787210.2017.1313703.
- 633 [37] A. Mahamar *et al*, 'Effect of three years' seasonal malaria chemoprevention on
634 molecular markers of resistance of Plasmodium falciparum to sulfadoxine-
635 pyrimethamine and amodiaquine in Ouelessebouyou, Mali', *Malar. J.*, vol. 21, no. 1, p.
636 39, Feb. 2022, doi : 10.1186/s12936-022-04059-z.
- 637 [38] Observatoire des données sur les maladies infectieuses (IDDO), 'SP Molecular
638 Surveyor', *Worldwide Antimalarial Resistance Network*, 02 février 2015.
639 <https://www.wwarn.org/tracking-resistance/sp-molecular-surveyor> (consulté le 10 mai
640 2023).
- 641 [39] A. Osborne *et al*, 'Characterizing the genomic variation and population dynamics of
642 Plasmodium falciparum malaria parasites in and around Lake Victoria, Kenya', *Sci. Rep.*,
643 vol. 11, no. 1, p. 19809, Oct. 2021, doi : 10.1038/s41598-021-99192-1.
- 644 [40] D. Abera, C. K. Kibet, T. Degefa, L. Amenga-Etego, J. L. Bargul, and L. Golassa,
645 'Genomic analysis reveals independent evolution of Plasmodium falciparum populations
646 in Ethiopia', *Malar. J.*, vol. 20, no. 1, p. 129, mars 2021, doi : 10.1186/s12936-021-
647 03660-y.
- 648 [41] H. A. Babiker, S. J. Pringle, A. Abdel-Muhsin, M. Mackinnon, P. Hunt, et D. Walliker,
649 'High-Level Chloroquine Resistance in Sudanese Isolates of *Plasmodium falciparum* Is
650 Associated with Mutations in the Chloroquine Resistance Transporter Gene *pfcr1* and
651 the Multidrug Resistance Gene *pfmdr1*', *J. Infect. Dis.*, vol. 183, no. 10, pp. 1535-1538,
652 mai 2001, doi : 10.1086/320195.
- 653 [42] G. Mombo-Ngoma *et al*, 'High prevalence of dhfr triple mutant and correlation with
654 high rates of sulphadoxine-pyrimethamine treatment failures in vivo in Gabonese
655 children', *Malar. J.*, vol. 10, p. 123, mai 2011, doi : 10.1186/1475-2875-10-123.
- 656 [43] A. F. Cowman, M. J. Morry, B. A. Biggs, G. A. Cross et S. J. Foote, "Amino acid
657 changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate

658 synthase gene of *Plasmodium falciparum*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no.
659 23, pp. 9109-9113, Dec. 1988, doi : 10.1073/pnas.85.23.9109.

660 [44] Organisation mondiale de la santé, *Stratégie technique mondiale de lutte contre le*
661 *paludisme 2016-2030*. Genève : Organisation mondiale de la santé, 2015. Consulté : 12
662 janvier 2023. [En ligne]. Disponible : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/176712>

663 [45] W. Stone *et al*, 'Single low-dose tafenoquine combined with dihydroartemisinin-
664 piperazine to reduce *Plasmodium falciparum* transmission in Ouelessebouyou, Mali : a
665 phase 2, single-blind, randomised clinical trial', *Lancet Microbe*, vol. 0, no. 0, Mar.
666 2022, doi : 10.1016/S2666-5247(21)00356-6.

667 [46] W. Stone *et al*, Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperazine combined
668 with single low-dose primaquine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria
669 transmission in Ouélessébougou, Mali : a four-arm, single-blind, phase 2/3, randomised
670 trial', *Lancet Microbe*, vol. 3, no. 1, pp. e41-e51, Jan. 2022, doi : 10.1016/S2666-
671 5247(21)00192-0.

672 [47] S. O. Oyola *et al*, 'Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried
673 blood spots using selective whole genome amplification', *Malar. J.*, vol. 15, no. 1, p.
674 597, déc. 2016, doi : 10.1186/s12936-016-1641-7.

675 [48] E. L. Clarke, S. A. Sundararaman, S. N. Seifert, F. D. Bushman, B. H. Hahn et D.
676 Brisson, "swga : a primer design toolkit for selective whole genome amplification",
677 *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 33, no. 14, pp. 2071-2077, juil. 2017, doi :
678 10.1093/bioinformatics/btx118.

679 [49] I. Letunic and P. Bork, 'Interactive Tree Of Life (iTOL) : an online tool for phylogenetic
680 tree display and annotation', *Bioinformatics*, vol. 23, no. 1, pp. 127-128, Jan. 2007, doi :
681 10.1093/bioinformatics/btl529.

682 [50] B. Q. Minh *et al*, 'IQ-TREE 2 : New Models and Efficient Methods for Phylogenetic
683 Inference in the Genomic Era', *Mol. Biol. Evol.*, vol. 37, no. 5, pp. 1530-1534, mai 2020,
684 doi : 10.1093/molbev/msaa015.

685 [51] P. Danecek et S. A. McCarthy, " BCFtools/csq : haplotype-aware variant consequences
686 ", *Bioinformatics*, vol. 33, no. 13, p. 2037-2039, juil. 2017, doi :
687 10.1093/bioinformatics/btx100.

688 [52] M. Gautier, A. Klassmann, et R. Vitalis, 'rehh 2.0 : a reimplement of the R package
689 rehh to detect positive selection from haplotype structure', *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 17,
690 no. 1, pp. 78-90, 2017, doi : 10.1111/1755-0998.12634.

691 [53] K. Caye, T. M. Deist, H. Martins, O. Michel, et O. François, 'TESS3 : fast inference of
692 spatial population structure and genome scans for selection', *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 16,
693 no. 2, pp. 540-548, 2016, doi : 10.1111/1755-0998.12471.

694 [54] S. F. Schaffner, A. R. Taylor, W. Wong, D. F. Wirth, and D. E. Neafsey, 'hmmIBD :
695 software to infer pairwise identity by descent between haploid genotypes', *Malar. J.*,
696 vol. 17, no. 1, p. 196, mai 2018, doi : 10.1186/s12936-018-2349-7.

697

698 FIGURE LEGENDS

699 **Figure 1. Structure de la population des isolats de *P. falciparum* collectés au Mali de 2007**
700 **à 2020.** (A) Carte du Mali présentant le nombre de cas de *Plasmodium falciparum*
701 nouvellement diagnostiqués pour 1 000 habitants en 2020 (échelle de couleurs) et indiquant les
702 sites de collecte des études MalariaGEN (cercle) et des essais cliniques New Drug
703 Combinations for *P. falciparum* Transmission Reduction (NECTAR) (triangle), colorés par le
704 nom du village ou de la ville. Cette carte a été générée à l'aide du package R *tmap* (version
705 3.3.3 ; <https://r-tmap.github.io/tmap/>) (B) Taux d'incidence de *P. falciparum* pour chaque site
706 de collecte (par couleur) de 2000 à 2020. (C) Complexité des infections estimée par le
707 coefficient de reproduction (métrique F_{ws}) par échantillon, classé par site d'étude, la couleur
708 indiquant l'année de collecte. La ligne de tendance grise en pointillés est à 0,95, les lignes en
709 pointillés indiquent la valeur moyenne de F_{ws} par groupe. (D, E) Visualisation de 962 isolats
710 maliens de *P. falciparum* par approximation et projection du manifold uniforme (UMAP),
711 colorés par site et par année de collecte, respectivement.

712
713 **Figure 2. Structure de la population des isolats maliens de *P. falciparum* dans le contexte**
714 **des populations africaines.** (A) Visualisation de 962 isolats de *P. falciparum* à l'échelle de
715 l'Afrique, dont 87 isolats collectés au Mali en 2019-2020 et 164 isolats maliens collectés en
716 2007-2020, par approximation et projection uniformes des plis (UMAP). Les régions africaines
717 où les isolats ont été collectés sont indiquées en couleur. (B) Arbre du maximum de
718 vraisemblance du même ensemble de données, annoté par les isolats maliens de 2019-2020
719 (anneau intérieur), la région africaine d'origine de l'échantillon (deuxième anneau), l'année de
720 collecte (troisième anneau) et le pays ouest-africain de collecte (anneau extérieur). (C)
721 Complexité des infections (coefficient F_{ws}) par échantillon pour chaque échantillon, groupé
722 par pays et séparant les isolats maliens 2019-2020 des isolats maliens 2007-2017. La ligne de
723 tendance grise en pointillés est à 0,95, les lignes en pointillés indiquent la valeur moyenne de
724 F_{ws} par groupe.

725
726 **Figure 3. Prévalence des polymorphismes nucléotidiques simples connus pour entraîner**
727 **une diminution de la sensibilité aux médicaments.** Les fréquences des allèles mineurs
728 (MAF) sont indiquées pour les isolats collectés de 2007 à 2020 au Mali pour les gènes associés
729 à la résistance aux médicaments, y compris (A) *pfcr1*, (B) *pfmdr1*, (C) *pfhdfr* et (D) *pfhdps*. Les
730 diagrammes circulaires en C et D représentent les fréquences auxquelles des combinaisons de
731 mutants *pfhdfr* et *pfhdps* ont été observées dans les isolats de *P. falciparum* collectés en 2007,
732 2013-2014, 2015-2017 et 2019-2020.

733
734 **Figure 4. Recherche de preuves d'une sélection directionnelle récente.** Les diagrammes de
735 Manhattan montrent l'analyse du (A) score d'haplotypes intégré (*iHS*) pour les SNP individuels
736 dans la population du Mali 2019-2020 et le test *Rsb* inter-populations pour les haplotypes
737 étendus comparant la population du Mali 2019-2020 à la (B) population du Mali 2007-2014 et
738 à la (C) population du Mali 2015-2017.

739

740 **Figure 5. Proportions d'ascendance de mélange à l'échelle du génome pour les**
741 **populations de *P. falciparum* sur l'ensemble du continent africain. (A)** Ascendances par
742 isolat (colonnes) pour chaque pays, classées par année de collecte croissante. L'astérisque
743 indique les isolats de Bandiagara au Mali. **(B)** Carte géographique des ascendances estimées
744 en utilisant K=5 populations ancestrales sur le continent africain.
745