

# Doctorat de l'Université de Toulouse

---

Etude des mutants de la dihydroptéroate synthase de  
*Plasmodium falciparum* porteurs de la mutation Ile431Val : du  
terrain à l'atome

---

Thèse présentée et soutenue, le 24 novembre 2025 par  
**EMILIE GUEMAS**

## **École doctorale**

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

## **Spécialité**

Microbiologie

## **Unité de recherche**

INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

## **Thèse dirigée par**

Antoine BERRY et Marie BRUT

## **Composition du jury**

Mme Elise DUBOUE-DIJON, Rapporteur, CNRS Ile-de-France

M. Stéphane PICOT, Rapporteur, Université de Lyon 1

Mme Stéphanie CABANTOUS, Examinatrice, INSERM Occitanie Pyrénées

Mme Lise MUSSET, Examinatrice, Institut Pasteur de la Guyane

M. Benoit WITKOWSKI, Examineur, Institut Pasteur de Madagascar

M. Antoine BERRY, Directeur de thèse, Université de Toulouse

Mme Marie BRUT, Co-directrice de thèse, Université de Toulouse

*So long as Woman has walked the earth, malaria may have stalked her.*

*Patrick E. Duffy and Robert S. Desowitz (2001)*

## Remerciements

À **Madame le Docteur Elise Duboué-Dijon** et **Monsieur le Professeur Stéphane Picot**, je vous remercie d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail et de votre présence au sein de ce jury.

A **Mesdames le Docteur Stéphanie Cabantous** et **le Docteur Lise Musset**, merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

A **Monsieur le Docteur Benoit Witkowski**, merci pour votre expertise lors de mes comités de thèse, et de votre présence au sein de ce jury.

À **Madame le Docteur Marie Brut**, merci de m'avoir fait découvrir, avec passion et patience la modélisation. Marie, merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, ta rigueur scientifique, et la confiance que tu m'as accordée tout au long de cette thèse. Ton dévouement sans faille force l'admiration.

À **Monsieur le Professeur Antoine Berry**, merci de m'avoir accueillie au sein de ton service et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse. Antoine, merci pour tes idées, toujours nombreuses, tes conseils et ton aide bienveillante. Merci pour la confiance que tu m'accordes au quotidien. Ce fut un plaisir de travailler avec toi sur ce projet, merci d'avoir permis qu'il se poursuive.

À **Madame le Docteur Sandie Ménard**, merci pour ton expertise et ton aide précieuse au quotidien qui ont rendu ce projet possible. Sandie, merci de m'avoir formée avec rigueur, de m'accompagner à chaque étape avec bienveillance, et d'avoir des réponses à chaque problème. Je suis admirative du travail que tu réalises au quotidien.

A **Madame le Docteur Agnès Aubouy**, merci pour votre expertise et votre participation à mes comités de thèse.

A **Madame le Docteur Chloé Bost**, merci d'avoir accepté d'être ma marraine dans cette aventure qu'est la thèse.

À **Nicolas Blanchard** et à **toute l'équipe EPIIC**, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe il y a maintenant 6 ans. **Nicolas**, merci pour tous tes conseils et tes questions toujours pertinentes qui font évoluer les projets.

À **Anne Hemeryck**, **Georges Landa** et à **toute l'équipe M3**, merci de votre accueil lors de mes venues au LAAS et de votre écoute attentive sur des sujets parfois un peu éloignés de votre quotidien.

À **Nicolas Jeanne**, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton expertise informatique.

A **Camille Mané**, merci pour ton expertise indispensable à la mise en place du dosage de la sulfadoxine.

**Aux biologistes du Service de Parasitologie-Mycologie, Judith, Sophie, Pamela, Elena, Camille, Antoine, Xavier et Alexis**, merci pour votre accueil et pour votre gentillesse dès mon

premier semestre d'internat parmi vous. Merci pour tout ce que vous m'avez appris durant ces années à vos côtés. **Judith**, merci de m'avoir accueillie dans ce bureau et d'avoir veillé sur moi. **Sophie**, merci pour ton écoute et ton expertise mycologique que tu partages au quotidien. **Pamela**, merci d'être là et compréhensive quand j'ai besoin de râler. **Elena**, merci de revenir parmi nous. **Xavier**, merci d'avoir mis en place, il y a plus de 7 ans, ce guet-apens qui a permis à ce que je sois restée avec vous en Parasitologie-Mycologie. **Alexis**, merci pour ces discussions sportives.

**Aux techniciens de laboratoire du Service de Parasitologie-Mycologie**, merci de m'avoir formée lorsque j'étais jeune interne et de votre confiance au quotidien.

**À Noémie et aux techniciens du service de virologie**, merci pour votre aide à la préparation des librairies PacBio.

**À Romain Coppé et Frédéric Ariey**, merci d'avoir cru en ce projet NGS. **Romain** merci pour ta promptitude dans tes analyses bio-informatiques et la réalisation de tes figures.

**À Olivier Silvie et Sylvie Briquet**, merci de votre participation à ce projet et de votre expertise sur *Plasmodium berghei*.

**À Dulce et Maysa**, merci d'avoir accepté de poursuivre ces travaux. Je vous confie DHPS, prenez-en soin, j'espère qu'elle vous fera vivre de bons moments !

**À tous ceux qui ont participé à ce projet**, merci d'avoir œuvré à ce beau travail.

**À Albert, toute son équipe et les patients**, merci pour votre accueil au Cameroun et de m'avoir permis de découvrir ce qu'est une étude de terrain, sur le terrain !

**À Hélène et Pierre**, merci pour tous ces moments passés ensemble. A très vite pour de nouvelles aventures.

**À Damien**, merci pour la relecture de ce manuscrit, la préparation du prochain marathon, et tellement plus.

**À mes anciens coloc's et mes proches**, merci de m'avoir écouté parler de sulfadoxine depuis 4 ans, et pour tout ce que vous m'apportez au quotidien.

**À mes parents**, merci pour tout ! Pour votre éternel soutien, votre amour et votre générosité. Vous pourrez désormais dire que tous vos enfants ont fini leurs études.

**À mes frères et sœur, leurs binômes, et mes neveu et nièces**, merci d'être présents au quotidien, de vos projets sportifs toujours aussi challengeant. Quel sera le prochain ?

Et à tous ceux que j'ai oublié, MERCI.

## Résumé

Les parasites du genre *Plasmodium*, protozoaires intraérythrocytaires à transmission vectorielle, sont les agents responsables du paludisme. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes paient le plus lourd tribut de cette parasitose et l'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de la grande majorité de la mortalité ( $\approx 600\,000$  décès par an). La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est la bithérapie à la base de la chimioprophylaxie du paludisme chez la femme enceinte et chez les enfants de moins de 5 ans. La SP bloque la synthèse des folates en inhibant 2 enzymes parasitaires, la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), respectivement. Ces stratégies de chimioprévention par la SP sont des outils efficaces pour lutter contre la morbi-mortalité imputable au paludisme, mais les résistances menacent leur efficacité. La relation entre les mutations des gènes codant pour la DHPS et la DHFR, et l'efficacité de l'association SP est complexe.

Une nouvelle mutation de la *PfDHPS*, Ile431Val, identifiée pour la première fois au Nigéria il y a quelques années, et fréquemment retrouvée avec 4 autres mutations formant le quintuple mutant **vagKgs** est peu étudiée. Ce travail de thèse avait pour objectif de décrire l'épidémiologie de cette mutation et des allèles associés, et d'évaluer leurs impacts sur la résistance à la sulfadoxine. Dans ce travail, les études de terrain ont permis de montrer que cette mutation Ile431Val, était d'origine africaine, exclusivement présente en Afrique de l'Ouest et Centrale, avec une fréquence supérieure à 50% dans certains sites. La mise en évidence de l'émergence récente et clonale du quintuple mutant **vagKgs**, corroborée au fait qu'il soit sur-représenté chez les femmes enceintes ayant reçu un traitement par SP, suggèrent un certain niveau de résistance à la sulfadoxine. La modélisation par dynamique moléculaire de la structure atomique de la *PfDHPS*, qui, jusqu'alors, était peu étudiée, et donc mal comprise, a révélé d'une part, le rôle déterminant de la boucle D2 dans les interactions avec le ligand naturel et la sulfadoxine, et d'autre part, la réorganisation substantielle du site actif du quintuple mutant **vagKgs**. L'obtention de ces structures a permis de débiter l'étude du mécanisme réactionnel de l'enzyme.

La poursuite des études de terrain, des évaluations biologiques *in vivo* et *in vitro*, et de la modélisation à l'échelle atomique sont nécessaires pour préciser le phénotype de résistance à la sulfadoxine de ces allèles de la *PfDHPS*, et déterminer dans quelle mesure l'efficacité des chimioprophylaxies par SP est menacée.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine, *PfDHPS*, résistance, modélisation, dynamique moléculaire

## Abstract

*Plasmodium* parasites, vector-borne intraerythrocytic protozoa, are the causative agents of malaria. Children under 5 years of age and pregnant women bear the brunt of this parasitic disease, and *Plasmodium falciparum* is responsible for the vast majority of deaths ( $\approx 600,000$  deaths per year). Sulfadoxine-pyrimethamine (SP) is the dual therapy used for malaria chemoprophylaxis in pregnant women and children under 5 years of age. SP blocks folate synthesis by inhibiting two parasitic enzymes, dihydrofolate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), respectively. These SP chemoprevention strategies are effective tools for combating malaria-related morbidity and mortality, but resistance threatens their effectiveness. The relationship between mutations in the genes encoding DHPS and DHFR and the efficacy of the SP combination is complex.

A new *Pf*DHPS mutation, Ile431Val, first identified in Nigeria a few years ago and frequently found associated with four other mutations forming the quintuple mutant **vagKgs**, has been little studied. The aim of this thesis was to describe the epidemiology of this mutation and associated alleles, and to assess their impact on sulfadoxine resistance. In this study, field studies showed that the Ile431Val mutation has an African origin, found exclusively in West and Central Africa, with a frequency of over 50% in some sites. The evidence of the recent and clonal emergence of the quintuple mutant **vagKgs**, corroborated by the fact that it is over-represented in pregnant women who have received SP treatment, suggests a certain level of resistance to sulfadoxine. Molecular dynamics modeling of the atomic structure of *Pf*DHPS, which until then had been little studied and therefore poorly understood, revealed, on the one hand, the decisive role of the D2 loop in interactions with the natural ligand and sulfadoxine and, on the other hand, the substantial reorganization of the active site of the quintuple mutant **vagKgs**. Obtaining these structures has enabled the study of the enzyme's reaction mechanism to begin.

Further field studies, *in vivo* and *in vitro* biological assessments, and atomic-scale modeling are needed to clarify the sulfadoxine resistance phenotype of these *Pf*DHPS alleles and determine the extent to which the efficacy of SP chemoprophylaxis is threatened.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine, *Pf*DHPS, resistance, modeling, molecular dynamics

## Table des matières

Liste des abréviations .....	i
Liste des Figures.....	iii
Listes des Tableaux .....	iv
Partie I : Synthèse bibliographique .....	1
I. Le paludisme.....	1
1. Généralités sur le paludisme .....	1
2. Les populations à risque.....	3
3. Les mesures de prévention.....	5
II. L'association sulfadoxine – pyriméthamine .....	16
1. Généralités sur les folates.....	16
2. Source des folates.....	17
3. Métabolisme des folates.....	22
4. Les inhibiteurs de la voie des folates .....	24
III. La résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la sulfadoxine - pyriméthamine .....	29
1. Les mutations de la <i>PfDHFR</i> .....	30
2. Les mutations de <i>PfDHPS</i> .....	32
3. Les haplotypes de <i>PfDHFR</i> et <i>PfDHPS</i> .....	36
4. Impact des traitements préventifs sur l'évolution des mutations de la <i>PfDHFR</i> et <i>PfDHPS</i> .....	37
5. Evaluation phénotypique des allèles <i>PfDHFR</i> et <i>PfDHPS</i> .....	38
IV. Etude structurale <i>in-silico</i> .....	52
1. Principe de la modélisation .....	52
2. Les structures de la <i>PfDHFR</i> .....	56
3. Les structures de la <i>PfDHPS</i> .....	58
Partie II : Travaux de recherche .....	71
I. Problématique et objectifs .....	72
II. Etude de l'évolution et de la propagation des mutations de DHPS de <i>Plasmodium falciparum</i> en Afrique Centrale .....	73
1. Introduction.....	73
2. Evolution and spread of <i>Plasmodium falciparum</i> mutations associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study .	74
3. Discussion .....	113

4. Perspectives.....	113
III. Effet du traitement préventif intermittent sur la sélection du quintuple mutant DHPS de <i>Plasmodium falciparum</i> chez les femmes enceintes.....	117
1. Introduction.....	117
2. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on selection of the new <i>P. falciparum</i> dhps quintuple mutant carrying the I431V mutation.....	117
3. Discussion.....	125
4. Perspectives.....	126
IV. Impact des mutations sur le site actif de la <i>PfDHPS</i> et sur la liaison à la sulfadoxine.....	129
1. Introduction.....	129
2. Deciphering the impact of mutations in <i>PfDHPS</i> active site and sulfadoxine binding: structural insights from molecular dynamics simulations.....	129
3. Discussion.....	166
4. Perspectives.....	167
V. Décryptage du mécanisme réactionnel de la <i>PfDHPS</i> .....	169
1. Introduction.....	169
2. Unravelling the <i>PfDHPS</i> catalytic mechanism through molecular dynamics simulations.....	169
3. Discussion.....	189
Conclusion générale.....	190
Références bibliographiques.....	193
Liste des publications.....	216
Liste des communications.....	217

## Liste des abréviations

ADC : Aminodeoxychorismate

ADCL : Aminodeoxychorismate lyase

ADCS : Aminodeoxychorismate synthase

AMBER : Assisted model building with energy refinement

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

CI50 : Concentration inhibitrice à 50%

CNR : Centre national de référence

CPS : Chimio-prévention du paludisme saisonnier

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CSA : Chondroïtine sulfate A

CTA : Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine

DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHFS : Dihydrofolate synthase

DHNA : Dihydroneoptérine aldolase

DHNTTP : Dihydroneoptérine triphosphate pyrophosphatase

DHPPP : Dihydroptérine pyrophosphate

DHPS : Dihydroptéroate synthase

DPO : Dual priming oligonucleotide

DTC : Diphtérie tétanos coqueluche

dTMP : désoxythymidine monophosphate

dTTP : deoxythymidine triphosphate

dUMP : désoxyuridine monophosphate

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FIGLU : Acide formiminoglutamique

FPGS : Folylpolylglutamate synthase

GLURP : Glutamate rich protein

GTP : Guanosine triphosphate  
GTPC : Guanosine triphosphate cyclohydrolase  
HPPK : 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine pyrophosphokinase  
HRP2 : Protéine 2 riche en histidine  
LDH : Lactate déshydrogénase  
MII : Moustiquaire imprégnée d'insecticide  
MM : Mécanique moléculaire  
MSP1 & 2 : merozoite surface protein 1 & 2  
MTHFR : 5,10-méthylène-THF-réductase  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
*p*ABA : Acide para-aminobenzoïque  
PAM : Paludisme associé à la grossesse  
*Pf*EMP1 : Protéine 1 de membrane de l'érythrocyte de *Plasmodium falciparum*  
6-PTPS : 6-pyruvoyl tétrahydroptérine synthase  
QM/MM : mécanique quantique / mécanique moléculaire  
RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction  
SAM : S-adenosyl méthionine  
SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase  
SP : Sulfadoxine-pyriméthamine  
TDR : Test de diagnostic rapide  
THF : Tétrahydrofolate  
TPIg : Traitement préventif intermittent pendant la grossesse  
TPIIn : Traitement préventif intermittent chez le nourrisson  
TS : Thymidylate synthase  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
WWARN : WorldWide Antimalarial Resistance Network

## Liste des Figures

Figure 1 : Distribution mondiale du paludisme en 2023 .....	2
Figure 2 : Liaison des érythrocytes infectés par <i>Plasmodium falciparum</i> au placenta .....	4
Figure 3 : Pays ayant signalé une résistance confirmée aux pyréthriinoïdes, 2018-2023 .....	6
Figure 4 : Utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides en Afrique subsaharienne entre 2000 et 2023 .....	6
Figure 5: Pourcentage de femmes enceintes consultant un service de soins prénatals au moins une fois et recevant le TPIg en Afrique subsaharienne de 2010 à 2023.....	9
Figure 6 : Zones d'implémentation de la chimioprévention du paludisme saisonnier et nombre de cycles de traitement, en 2023 .....	11
Figure 7 : Structure des folates.....	17
Figure 8 : Biosynthèse des folates.....	18
Figure 9 : Conversion du chorismate en acide para-aminobenzoïque.....	20
Figure 10 : Le métabolisme des folates.....	23
Figure 11 : Fonction de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS .....	26
Figure 12 : Les inhibiteurs de la DHFR utilisés en clinique .....	27
Figure 13 : Fréquence des mutants <i>PfDHFR</i> sur le continent africain.....	32
Figure 14 : Evolution spatiotemporelle estimée des mutations (i) Ala437Gly, (ii) Lys540Glu et (iii) Ala581Gly de la <i>PfDHPS</i> .....	35
Figure 15 : Délai médian de réinfection après une prise de sulfadoxine – pyriméthamine en fonction de la prévalence de la mutation Lys540Glu de la <i>PfDHPS</i> .....	40
Figure 16 : Probabilité de protection par la SP pour différents génotypes de la <i>PfDHPS</i> .....	41
Figure 17 : Variabilité de la détermination de la CI50 à la sulfadoxine, pour une même souche de <i>Plasmodium falciparum</i> (Dd2) .....	49
Figure 18 : Equation de l'énergie du système par mécanique moléculaire classique .....	54
Figure 19 : Représentation schématique de l'approche hybride mécanique quantique / mécanique moléculaire (QM/MM) .....	55
Figure 20 : Réaction catalysée par la dihydrofolate réductase .....	56
Figure 21 : Structure globale de la dihydroptéroate synthase de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	58
Figure 22 : Structure de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de <i>Plasmodium falciparum</i>	60
Figure 23 : Conformation des boucles de la dihydroptéroate synthase de <i>P. falciparum</i> .....	61
Figure 24 : Interaction de l'acide ptéroïque avec la <i>PfDHPS</i> de type sauvage.....	61
Figure 25 : Résidus de la <i>PfDHPS</i> pouvant être en contact avec la sulfadoxine .....	63

Figure 26 : Réaction catalysée par la dihydroptéroate synthase .....	65
Figure 27 : Substitutions nucléophile d'ordre 1 (S <sub>N</sub> 1) et d'ordre 2 (S <sub>N</sub> 2).....	66
Figure 28 : Proposition de la géométrie de l'état de transition de la réaction catalysée par la DHPS.....	67
Figure 29 : Substitution nucléophile d'ordre 1 (S <sub>N</sub> 1) de la DHPS proposée par Yun <i>et al.</i> ....	68
Figure 30 : Mécanisme réactionnel de la DHPS .....	69
Figure 31 : Formation de sulfathiazole–DHP lié au site actif de la DHPS de <i>Bacillus anthracis</i> .....	70
Figure 32 : Principe de la technologie dual priming oligonucleotide (DPO).....	114
Figure 33 : Parasitémie après infection puis traitement par sulfadoxine .....	116
Figure 34 : Fréquence de l'allèle <i>vagKgs</i> selon la technologie de séquençage utilisée.....	127

## Listes des Tableaux

Tableau 1 : Mutations connues de l'enzyme <i>PfDHFR</i> .....	31
Tableau 2 : Mutations connues de l'enzyme <i>PfDHPS</i> .....	33

## **Partie I : Synthèse bibliographique**

## I. Le paludisme

### 1. Généralités sur le paludisme

Le paludisme ou malaria, étymologiquement « le mal des marais », est causé par des protozoaires intra-érythrocytaires appartenant au genre *Plasmodium*. Ces hématozoaires Apicomplexa ont été décrits, pour la première fois, en 1880 à Constantine (Algérie), par Charles-Louis Alphonse Laveran (1), un médecin militaire français qui sera récompensé pour ses travaux par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1907 (2). Cette parasitose est connue depuis très longtemps. Des manuscrits chinois datant de 2700 avant Jésus-Christ font référence à des symptômes semblables à ceux du paludisme (3). La première preuve formelle d'infection (présence d'ADN de *Plasmodium*) a été retrouvée dans des momies égyptiennes datant du XIV<sup>e</sup> siècle avant Jésus-Christ (4).

Le paludisme est un problème majeur de santé publique. Il s'agit d'une maladie infectieuse vectorielle, endémique dans 83 pays (figure 1) et transmise par les moustiques femelles du genre *Anopheles*. En 2023, au niveau mondial, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé le nombre de cas de paludisme à 263 millions, ayant entraîné 597 000 décès. La majorité de ces accès palustres surviennent sur le continent africain (94%) et près de 40% ont été recensés dans deux pays : le Nigéria (26%) et la République Démocratique du Congo (13%) (5). Au début du XXI<sup>e</sup> siècle, une forte intensification de la lutte antipaludique a permis une diminution importante de la morbidité et de la mortalité imputable au paludisme. Le nombre de décès dus au paludisme a diminué, passant de 861 000 en 2000 à 567 000 en 2019 (5). Cependant, depuis 10 ans, le nombre de cas de paludisme demeure stable, voire augmente dans certains pays (5).

Il existe plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* infectant diverses espèces animales. Cinq espèces de *Plasmodium* sont connues pour être impliquées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Depuis 2010, l'espèce *P. ovale* est divisée en deux espèces sympatriques non recombinantes : *Plasmodium ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* (6). Les décès dus au paludisme sont très majoritairement causés par *P. falciparum*, espèce la plus répandue à l'échelle mondiale et la plus associée aux problématiques de résistance, responsable d'échec thérapeutique (7).

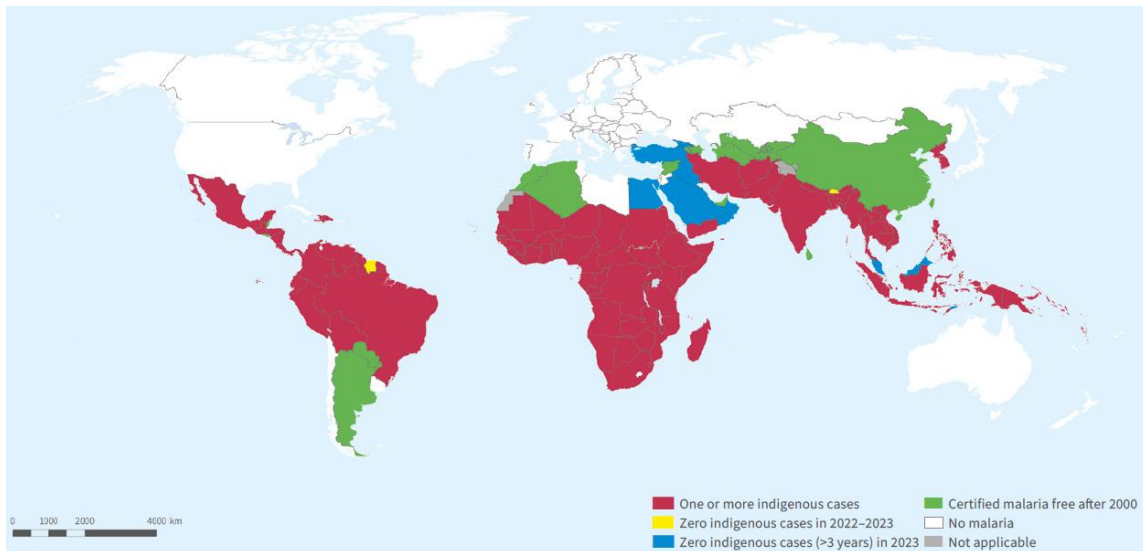


Figure 1 : Distribution mondiale du paludisme en 2023

(OMS, 2024)

La prise en charge des accès palustres, par un diagnostic rapide et un traitement efficace, est essentielle pour limiter son impact. Les symptômes du paludisme sont aspécifiques, se manifestant généralement par de la fièvre, des céphalées, des douleurs arthro-myalgiques et des troubles gastro-intestinaux. En zone d'endémie, le diagnostic du paludisme repose sur deux méthodes : une technique microscopique ou une technique immuno-chromatographique, à l'aide de test de diagnostic rapide (TDR) permettant la mise en évidence d'antigènes parasitaires. Ces TDR présentent un intérêt majeur du fait de leur rapidité et de leur simplicité d'utilisation ainsi que de leur sensibilité et spécificité (en particulier pour *P. falciparum*). Trois groupes d'antigènes peuvent être utilisés : (i) l'aldolase, produite par toutes les espèces de *Plasmodium*, (ii) la lactate déshydrogénase (LDH), commune à toutes les espèces de *Plasmodium* (pLDH) ou spécifiques d'une espèce particulière (ex : PvLDH spécifique de *P. vivax*) et (iii) la protéine 2 riche en histidine (HRP2), produite uniquement par *P. falciparum*. La détection de HRP2 présente une sensibilité beaucoup plus importante que celle des autres cibles (8). Les techniques microscopiques, que sont la goutte épaisse et le frottis sanguin, permettent la visualisation des formes plasmodiales. La goutte épaisse est une technique de concentration, alors que le frottis sanguin, moins sensible, permet de déterminer l'espèce plasmodiale et la parasitémie. Actuellement, le traitement de première intention pour les accès palustres non compliqués à *P. falciparum* repose sur les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) (8). L'artémisinine, extrait de l'*Artemisia annua*, a été découverte dans les années 1970 par la Professeur Youyou Tu, qui sera récompensée en 2015 par le prix Nobel

de médecine et physiologie (9). Son utilisation combinée à une drogue partenaire présente un intérêt majeur pour la prévention de la résistance aux antipaludiques.

Malgré plus d'un siècle d'efforts pour éradiquer ou contrôler cette maladie, le paludisme continue d'affecter de manière significative les personnes et les communautés vivant dans la pauvreté et dans des situations de vulnérabilité (5).

## **2. Les populations à risque**

Certains groupes de la population présentent un risque plus élevé de contracter le paludisme et d'être gravement atteints.

### **2.1. Les enfants de moins 5 ans**

Dans les zones de forte endémie, une exposition importante à *P. falciparum*, par des piqûres régulières de moustiques infectés, entraîne le développement progressif d'une prémunition, qui se traduit par une protection contre les formes graves, sans pour autant constituer une immunité stérilisante. Les adultes sont donc généralement protégés contre les formes cliniques sévères (10). Cependant, les enfants de moins de 5 ans n'ont pas encore acquis cette prémunition et sont donc les premières victimes de cette parasitose. En effet, 75 % des décès dus au paludisme concernent les enfants de moins de 5 ans (5). Sur le continent africain, le paludisme représente l'une des trois principales causes de décès chez les enfants de moins de 5 ans, avec les infections respiratoires, et les diarrhées (11, 12).

### **2.2. Les femmes enceintes**

La grossesse est également une période de vulnérabilité au paludisme, et les femmes enceintes représentent la deuxième population à risque. En 2023, dans 33 pays africains, à transmission palustre modérée à élevée, 12,4 millions de femmes enceintes ont été infectés par le paludisme (5). Les risques liés au paludisme gestationnel s'expliquent par la cytoadhérence de *P. falciparum* dans le placenta (figure 2), interface entre la mère et le fœtus. Les érythrocytes infectés par *P. falciparum* s'accumulent dans les espaces intervilloux du placenta. Ce tropisme est médié par un antigène parasitaire, var2CSA, codé par le gène *var*, exprimé sur la membrane des érythrocytes infectés (13). Cette protéine de surface, membre de la famille de la protéine 1 de membrane de l'érythrocyte de *P. falciparum* (*PfEMP1*), a pour ligand la chondroïtine sulfate A (CSA) présente uniquement sur la paroi du syncytiotrophoblaste (14). La présence des érythrocytes infectés dans le placenta provoque un environnement inflammatoire, avec une

infiltration de leucocytes qui produisent des cytokines pro-inflammatoires. Cela contribue à l'épaississement de la membrane basale placentaire et à l'altération du système d'échange entre la mère et le fœtus (15). Les femmes produisent des anticorps contre la CSA qui bloquent l'adhésion des hématies infectées, avec une activité protectrice qui augmente avec le nombre de grossesse : une immunité spécifique est acquise par des grossesses successives. Ces anticorps anti-adhésion limitent l'accumulation de parasites dans le placenta et protègent les femmes multipares du paludisme gestationnel (16). Dans les zones de forte transmission, la primiparité et le jeune âge maternel (en particulier l'adolescence) sont deux facteurs de risque indépendants pour l'infection par le paludisme au cours de la grossesse (17).

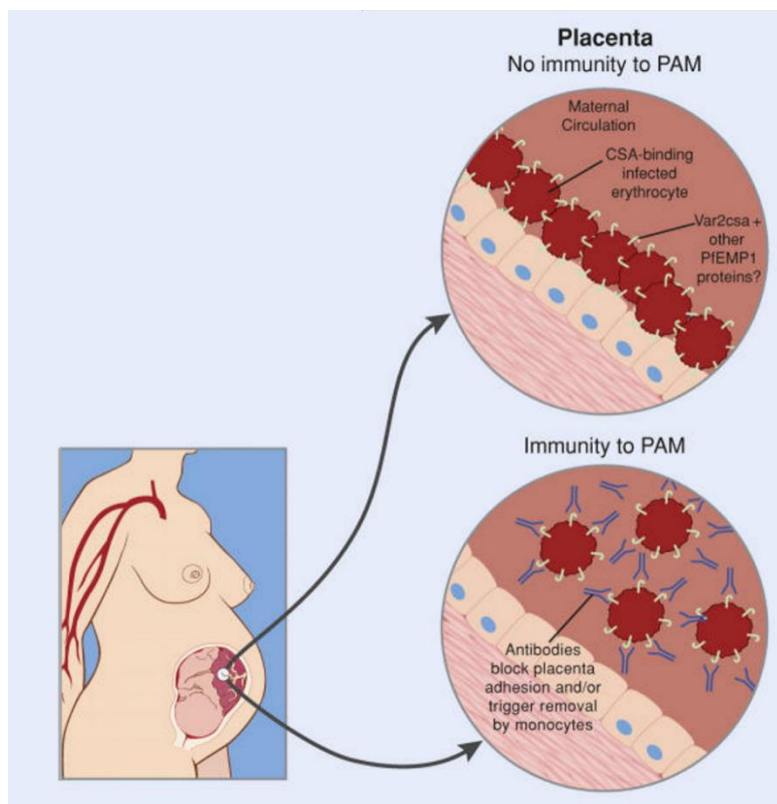


Figure 2 : Liaison des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* au placenta

PAM : paludisme associé à la grossesse (Smith, 2004)

L'infection par le paludisme pendant la grossesse présente des risques importants pour la femme, le fœtus et le nouveau-né. Chez les femmes enceintes, le paludisme gestationnel peut entraîner un avortement spontané, un accouchement prématuré, une anémie maternelle sévère, et augmente la mortalité maternelle. En Afrique, l'anémie sévère touche 5 à 10% des femmes enceintes et un cas d'anémie sévère sur quatre est attribuable au paludisme (17). Pour le fœtus, les conséquences sont un retard de croissance *in utero*, un faible poids à la naissance (défini

comme un poids à la naissance inférieur à 2 500 grammes) et une mortalité néonatale et infantile. De plus, le paludisme pendant la grossesse aurait un impact négatif sur le développement cognitif, moteur et comportemental de l'enfant (18). Le faible poids à la naissance est l'une des principales causes de mortalité néonatale et infantile dans le monde. Les nourrissons nés avec un faible poids à la naissance présentent un risque plus élevé de retard de croissance précoce, de maladies infectieuses, de retard de développement, de décès pendant la petite enfance et de maladies chroniques à l'âge adulte (19, 20).

En 2023, en Afrique subsaharienne, on estime le nombre de nouveau-nés avec une insuffisance pondérale à environ 350 000 (5). Dans ces zones de forte transmission du paludisme, le faible poids à la naissance est imputable au paludisme dans un cas sur cinq (17).

Dans les régions où la transmission du paludisme est faible (Asie et Amérique latine), la lutte contre le paludisme pendant la grossesse repose principalement sur le diagnostic précoce (5). A l'inverse, dans les régions de forte transmission comme en Afrique sub-saharienne, un traitement préventif est recommandé chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins de 5 ans.

### **3. Les mesures de prévention**

Il a été montré, depuis plus de 30 ans, que la prévention du paludisme pendant la grossesse était associée à une diminution du risque de faible poids à la naissance et de mortalité néonatale (21). Différentes mesures de prévention ont été déployées en zone d'endémie : des moustiquaires imprégnées d'insecticide sont utilisées comme mesure de lutte antivectorielle. Des traitements préventifs sont également recommandés par l'OMS chez les populations à risque. Enfin, des mesures vaccinales sont mises en œuvre depuis quelques années, avec un déploiement de deux vaccins (RTS,S et R21) chez les enfants en zone d'endémie (22, 23).

#### **3.1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide**

En 2023, 226 millions de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) ont été distribués dans les pays endémiques, dont 86% en Afrique sub-saharienne (5). L'émergence et la propagation de la résistance des moustiques aux insecticides constituent un défi important pour la prévention du paludisme. Les insecticides les plus fréquemment utilisés pour imprégner les moustiquaires sont les pyréthrinoïdes. La résistance aux pyréthrinoïdes a été confirmée dans 55 des 64 pays où elle a été surveillée de 2018 à 2023 (5) (figure 3). Désormais, l'OMS recommande les moustiquaires de nouvelle génération qui sont imprégnées de deux classes d'insecticides. Deux

combinaisons sont, à ce jour, disponibles : l'association de pyréthrinoïdes-chlorfénapyr, qui est privilégiée par l'OMS, ou la combinaison de pyréthrinoïdes-pyriproxifène (8).

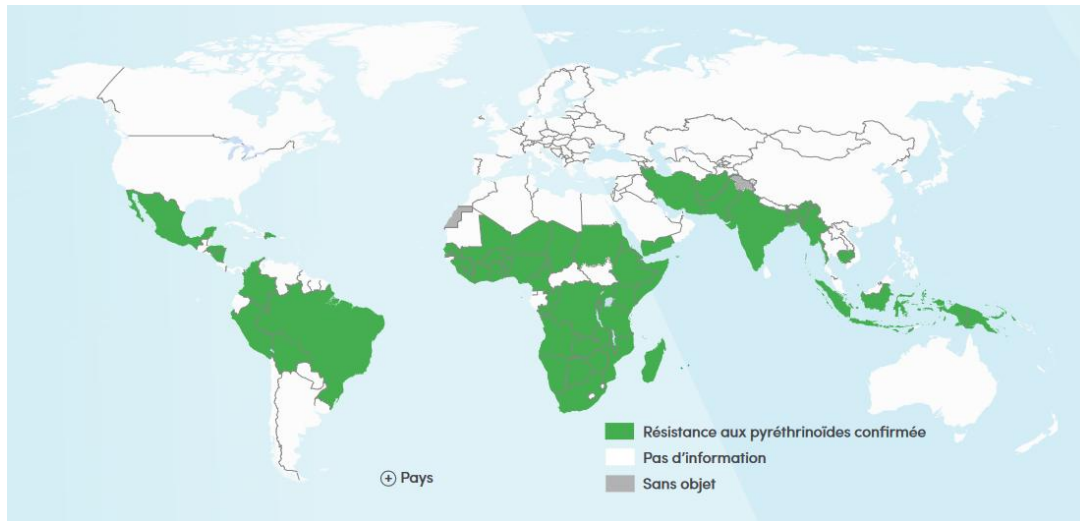


Figure 3 : Pays ayant signalé une résistance confirmée aux pyréthrinoïdes, 2018-2023  
(OMS, 2024)

Le pourcentage de la population dormant sous MII a augmenté de manière progressive entre les années 2000 et 2023, passant de 2% à 52% pour l'ensemble de la population, de 3% à 59% chez les enfants de moins de 5 ans et de 3% à 59% chez les femmes enceintes (figure 4) (5). Ainsi, plus de 20 ans ont été nécessaires pour que 50% de la population en zone d'endémie en utilise.

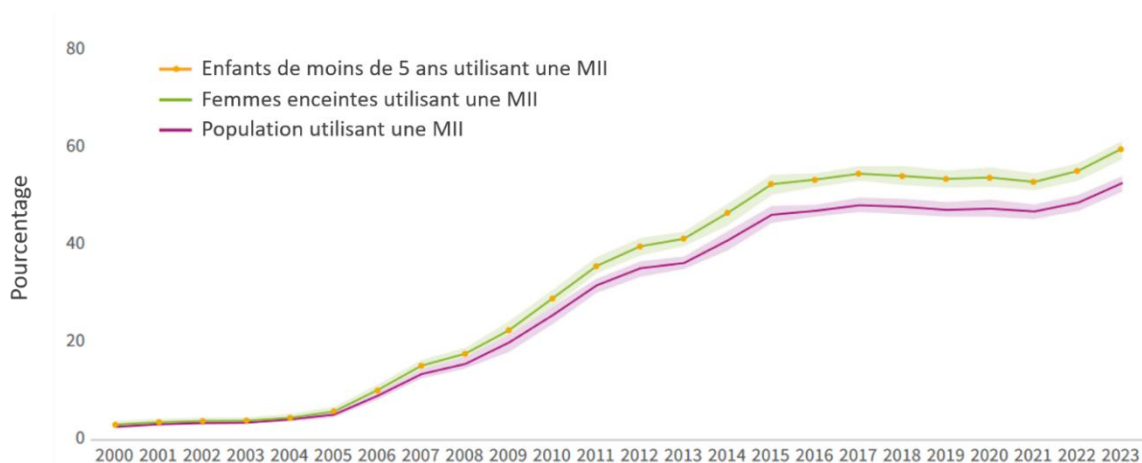


Figure 4 : Utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides en Afrique subsaharienne entre 2000 et 2023

MII : moustiquaire imprégnée d'insecticide

(adaptée de OMS, 2024)

### 3.2. Les traitements préventifs

Les traitements préventifs sont recommandés par l'OMS chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins de 5 ans.

#### a. Le traitement préventif intermittent pendant la grossesse

Le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg) consiste en l'administration d'un traitement antipaludique chez la femme enceinte.

L'OMS recommandait, à partir de 1984, dans les zones d'endémie palustre, une prophylaxie hebdomadaire par chloroquine (24). Cependant, la propagation de la résistance à la chloroquine, la mauvaise observance des prises hebdomadaires et les effets secondaires, notamment les problèmes de prurit liés à la chloroquine, ont limité l'application de cette stratégie (25). Le TPIg par sulfadoxine – pyriméthamine (SP) a été introduit dès les années 1990, au Malawi et au Kenya (26, 27). Au Malawi, région où la transmission de *P. falciparum* résistant à la chloroquine était élevée, ce TPIg par SP montrait de meilleurs résultats, sur la prévention du paludisme gestationnel et la mortalité néonatale, que le traitement préventif par administration hebdomadaire de chloroquine (26). Au début des années 2000, le comité d'experts sur le paludisme de l'OMS a recommandé l'utilisation de la SP pour le TPIg (28). Cette prophylaxie a été associée à des réductions substantielles de la morbidité due au paludisme. Une revue Cochrane de six essais réalisées au Kenya, au Mozambique et en Ouganda a comparé l'efficacité du TPIg avec deux doses ou plus de SP par rapport à un placebo ou à l'absence d'intervention (29). Elle a montré que chez les femmes enceintes, le TPIg par SP permettait de réduire le risque relatif d'avortements spontanés de 39%, d'anémie sévère de 40% et de parasitémie prénatale de 62%. Chez le nourrisson, le TPIg permettait une réduction du risque relatif de faible poids à la naissance de 19%. Enfin, aucun effet indésirable de type ictère ou anomalie congénitale n'a été détecté. Une méta-analyse de sept essais a ensuite montré que le TPIg avec trois doses de SP ou plus, par rapport à un schéma à deux doses de SP, était associé à un poids de naissance plus élevé et à une diminution du risque de faible poids à la naissance, avec une réduction du risque relatif de 20%. L'administration d'une troisième dose de SP permettait également une réduction de l'anémie maternelle sévère chez les femmes au cours de leur première ou deuxième grossesse. Enfin, aucune différence concernant les événements indésirables graves n'était observée (30). Sur la base de ces données, l'OMS a mis à jour sa politique en 2012 en recommandant désormais, un minimum de trois doses de SP au cours de la grossesse (31).

Dans les dernières recommandations de l’OMS pour le paludisme, publiées en novembre 2024, il est mentionné que le TPIg est recommandé au cours des deuxième et troisième trimestres de grossesse, jusqu’à l’accouchement, et repose sur l’administration, à chaque visite prénatale, d’une dose de SP, avec un objectif d’au moins trois doses au cours de la grossesse (8). L’intervalle entre deux doses de SP doit être au minimum d’un mois. Une dose correspond à 1 500 mg de sulfadoxine et 75 mg de pyriméthamine, soit trois comprimés de 500 mg/25 mg de SP. Il s’agit d’une dose unique, administrée par voie orale, idéalement sous observation directe, au cours de la visite prénatale, afin de garantir l’observance. La SP est peu coûteuse (32), bien tolérée (33), bien absorbée par voie orale et sa demi-vie lui permet d’être administrée une fois par mois, ce qui en fait un médicament de choix pour la chimioprophylaxie. La demi-vie plasmatique est d’environ 4 jours pour la pyriméthamine et de 8 jours pour la sulfadoxine (34).

Une faible dose d’acide folique (0,4 mg/jour), permettant la diminution des risques d’anomalies du tube neural (35), peut être administrée simultanément à la SP, mais des doses élevées d’acide folique (à partir de 5 mg/jour) diminuent l’efficacité de la SP (36). Le TPIg par SP n’est pas recommandé avant la treizième semaine de grossesse en raison du manque de données concernant la tératogénicité potentielle de la SP au cours de cette période (37). Le TPIg par SP est contre-indiqué en cas d’allergie ou de traitement par cotrimoxazole (triméthoprime – sulfaméthoxazole) utilisé, notamment, en prophylaxie des infections opportunistes chez les femmes immunodéprimées par le virus de l’immunodéficience humaine (VIH) (8). En effet, en Afrique sub-saharienne, malgré le million de grossesses concernées chaque année par une co-infection paludisme et VIH (38) et l’augmentation significative de la prévalence du paludisme chez les femmes enceintes infectées par le VIH, l’administration concomitante de cotrimoxazole et de SP est contre-indiquée en raison du risque élevé de toxicité des sulfamides (8). Les femmes enceintes atteintes du VIH en Afrique subsaharienne doivent utiliser le cotrimoxazole plutôt que la SP, si le taux de lymphocytes T CD4 est inférieur à  $350/\text{mm}^3$ . Il a été montré que la prophylaxie quotidienne par le cotrimoxazole (480 mg ou 960 mg selon les études) chez les femmes enceintes atteintes du VIH n’était pas inférieure au TPIg par SP recommandé par l’OMS, en ce qui concerne la réduction de la mortalité infantile, du faible poids à la naissance et de la mortalité maternelle (39). Le cotrimoxazole est également bien toléré (39), mais cette prophylaxie doit être prise quotidiennement.

En tenant compte de l’impact actuel du TPIg, on estime qu’en 2023, le faible poids à la naissance a été évité chez environ 551 000 nouveau-nés (5). Cependant, bien que le TPIg par SP soit

recommandé depuis plus de 20 ans par l'OMS, la couverture du TPIg reste, à ce jour, inférieure à l'objectif fixé, qui est de 80%. En effet, en 2023, seuls 44 % des femmes enceintes éligibles dans 34 pays africains (5) ont bénéficié des trois doses ou plus recommandées (figure 5). Si le pourcentage de femmes enceintes recevant au moins trois doses de SP au cours de la grossesse passait à 90%, l'insuffisance pondérale à la naissance serait évitée chez 175 000 nouveau-nés supplémentaires (5). Les raisons de la faible couverture du TPIg sont nombreuses (40). Une des problématiques est le lieu de résidence des femmes enceintes. En effet, dans les zones rurales, la distance entre le domicile et l'établissement de santé peut être importante, ce qui impacte le nombre de prises de SP (41). L'âge gestationnel lors de la première visite prénatale est également déterminant. Le pourcentage de femmes recevant trois doses de SP ou plus est plus élevé lorsque les femmes commencent les visites prénatales au cours du premier trimestre (41–44). Enfin, le niveau d'éducation, la connaissance des avantages du TPIg par SP, la disponibilité de la SP et la formation du personnel en charge des soins sont également associés au taux de couverture du TPIg (41, 44, 45).

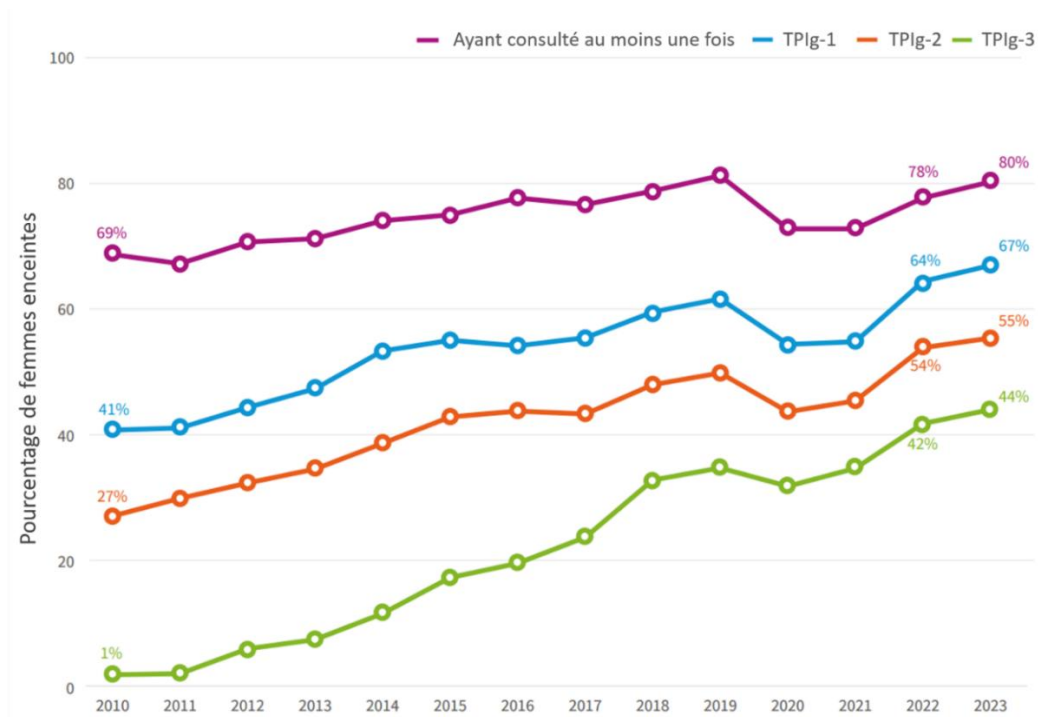


Figure 5: Pourcentage de femmes enceintes consultant un service de soins prénatals au moins une fois et recevant le TPIg en Afrique subsaharienne de 2010 à 2023

TPIg : Traitement préventif intermittent pendant la grossesse

(adaptée de OMS, 2024)

Plusieurs études ont évalué d'autres molécules pouvant être utilisées comme alternative à la SP pour le TPIg (46). La tolérance de la chloroquine (47), de l'amodiaquine (48), de la méfloquine (49) et de l'azithromycine (50), utilisées comme TPIg, étaient moins bonne que la tolérance de la SP. Au Malawi, une étude pour comparer une prophylaxie par chloroquine au TPIg par SP a été menée entre 2012 et 2014 chez 900 femmes (47). Dans cette étude, il n'a pas été retrouvé de mutation du gène *pfcr* sur les isolats de *P. falciparum*. Les femmes recevaient une prophylaxie hebdomadaire par chloroquine, deux traitements par chloroquine au cours de la grossesse ou le TPIg par SP. Il n'a pas été observé de différence significative, ni sur le risque d'infection par le paludisme, ni sur le poids à la naissance. Les deux schémas comprenant de la chloroquine ont été associés à des taux plus élevés d'événements indésirables liés au traitement que le TPIg par SP. Les effets indésirables les plus enregistrés chez les femmes ayant reçu la chloroquine étaient les vertiges, les vomissements, les nausées, les palpitations, les maux de tête et les douleurs abdominales. Au Ghana, un TPIg par amodiaquine a été comparé à un TPIg par SP entre 2004 et 2007 chez 5 000 femmes (48). Il n'a pas été observé de différence sur la parasitémie, l'anémie maternelle et le faible poids à la naissance entre les groupes. Les femmes ayant reçu de l'amodiaquine ont déclaré significativement plus d'événements indésirables. Les symptômes les plus fréquemment rapportés étaient des douleurs, des faiblesses corporelles, des vertiges, des vomissements et des nausées.

En raison de l'apparition de résistance à la SP, que nous aborderons ultérieurement, l'association dihydroartémisine-pipéraquline a été évaluée. Son utilisation est une alternative intéressante, qui était associée, sur une étude menée en 2014 en Ouganda, à une diminution de l'incidence du paludisme symptomatique pendant la grossesse par rapport à un TPIg par SP. Dans cette étude, la prophylaxie par dihydroartémisine-pipéraquline était administrée pendant 3 jours consécutifs, soit de manière mensuelle, soit 3 fois au cours de la grossesse (51). Une étude de supériorité, menée entre 2016 et 2019 en Ouganda, n'a pas permis de mettre en évidence une supériorité du TPIg mensuel par dihydroartémisine-pipéraquline par rapport à un TPIg mensuel par SP (52). Ces traitements étaient bien tolérés, sans différence significative sur les événements indésirables entre les groupes. Cependant, la combinaison dihydroartémisine-pipéraquline est une CTA utilisée comme traitement curatif de première intention et représente actuellement la dernière ligne thérapeutique efficace. Au vu de l'émergence et de la propagation d'une moindre sensibilité de l'artémisinine en Afrique (53), l'utilisation d'une même association comme traitement préventif et curatif ne semble pas opportun. Outre sa demi-vie longue et son faible coût, la SP a l'avantage d'appartenir à une classe thérapeutique différente

des CTA. Ainsi, malgré les résistances de *P. falciparum* aux antifolates, la SP reste, à ce jour, le seul traitement recommandé pour le TPIg par l'OMS.

### b. La chimioprévention du paludisme saisonnier

La chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS), anciennement connue sous le nom de traitement préventif intermittent chez le nourrisson (TPIIn), a été recommandée par l'OMS pour la première fois en 2012 (54). Onze ans plus tard, elle est mise en œuvre dans 19 pays d'Afrique sub-saharienne. Depuis, le nombre moyen d'enfants recevant au moins une dose de CPS continue d'augmenter, avec 53 millions d'enfants traités en 2023 (5).

La CPS s'adresse aux enfants âgés 3 mois à 5 ans, et consiste en l'administration intermittente de traitements antipaludiques à dose curative pendant la période de forte transmission du paludisme (55). Cela permet de maintenir des concentrations suffisamment élevées dans le sang tout au long de la période où le risque est le plus élevé. Ce traitement préventif repose sur l'utilisation de l'amodiaquine associée à la SP tous les 28 jours, au début de la période de forte transmission, soit 3 à 5 cycles selon le contexte local (figure 6). La période prophylactique de l'amodiaquine est d'environ 17 jours (56).

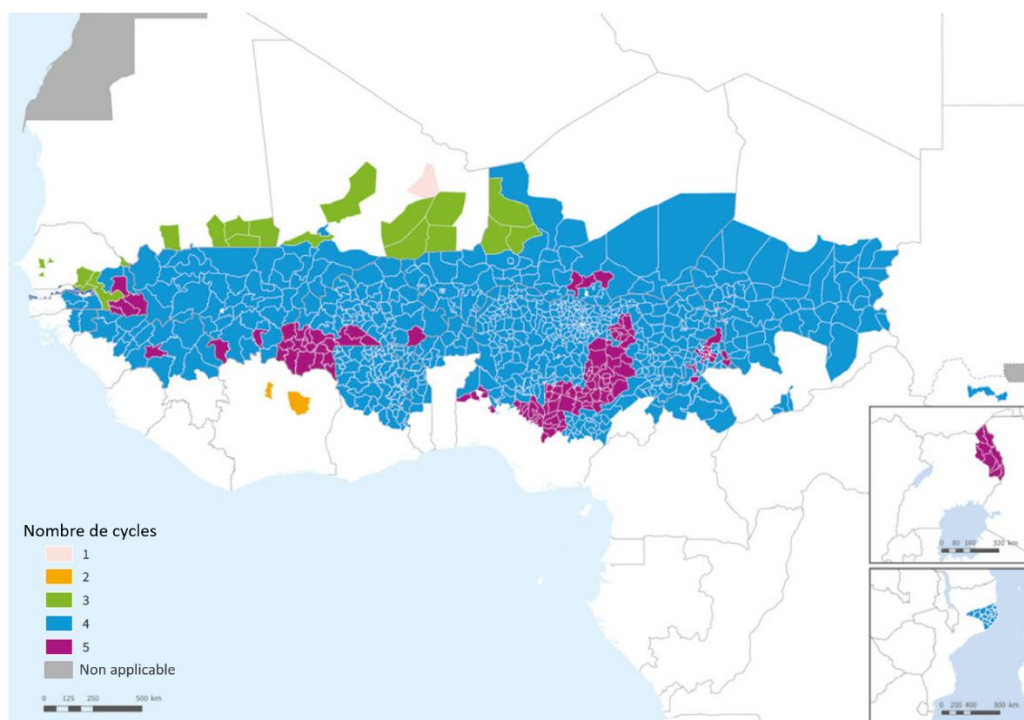


Figure 6 : Zones d'implémentation de la chimioprévention du paludisme saisonnier et nombre de cycles de traitement, en 2023

(adaptée de OMS, 2024)

La CPS est recommandée dans les zones de forte transmission saisonnière du paludisme, en particulier dans la région du Sahel. Au début de chaque cycle, les enfants reçoivent une dose de SP administrée le premier jour et 3 comprimés d'amodiaquine, à raison d'un comprimé par jour pendant 3 jours. La posologie dépend de l'âge de l'enfant. Les enfants âgés de 3 à 12 mois reçoivent un comprimé de 250 mg/12,5 mg de SP et trois comprimés de 75 mg d'amodiaquine. Chez les enfants âgés de 1 à 5 ans, les doses sont doublées, avec un comprimé de 500 mg/25 mg de SP et trois comprimés de 150 mg d'amodiaquine. Tous les enfants éligibles au traitement lors du premier cycle de CPS, restent éligibles tout au long de la campagne. A l'inverse, les enfants qui atteignent l'âge recommandé pour la CPS au cours de la campagne, doivent recevoir la CPS à partir de ce moment-là (55). La CPS est contre-indiquée en cas d'allergie ou de traitement par cotrimoxazole (triméthoprim – sulfaméthoxazole).

Afin de permettre à l'ensemble des enfants éligibles de recevoir la CPS, plusieurs stratégies de distribution sont mises en place, selon le pays et le contexte (57). La distribution peut être réalisée de porte-à-porte, où les agents de santé communautaires délivrent directement les traitements. La distribution à point fixe consiste à livrer la CPS dans des lieux établis au sein du système de santé de routine. Enfin, la distribution à point mobile consiste à la distribution temporaire dans des postes de santé ou des lieux communautaires tels que des écoles, des églises ou des espaces ouverts.

La CPS permet de réduire la morbidité et la mortalité dues au paludisme. Une revue Cochrane de sept essais menés en Afrique de l'Ouest a montré que la CPS avait permis une diminution de 75% des cas de paludisme et des accès graves (58). Une étude observationnelle, menée en 2015 et 2016, a montré que la CPS était associée, pendant la période de forte transmission au Burkina Faso et en Gambie, à une réduction du nombre de décès dus au paludisme de l'ordre de 40% et 50%, respectivement (59). Enfin, une étude menée au Mali en 2015 dans des zones ayant ou non mis en œuvre la CPS, a montré que la CPS était associée à une réduction substantielle des admissions à l'hôpital et de la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans (60).

La CPS par SP et amodiaquine a une bonne tolérance puisque les effets indésirables graves sont rares (59). La perception communautaire de la CPS est plutôt bonne. En effet, dans une étude réalisée au Mali en 2021, 97,6 % des parents déclaraient faire confiance à la CPS, 76,9 % que la CPS protégeait réellement leurs enfants du paludisme et 93,4 % étaient favorables à l'administration de la CPS à leurs enfants l'année suivante (61). Enfin, d'un point de vue financier, la CPS est considérée comme une intervention peu coûteuse et rentable pour la

prévention du paludisme. En 2016, dans 7 pays du Sahel (Burkina Faso, Gambie Guinée, Mali, Niger, Nigeria et Tchad), il est estimé que la CPS a permis une économie de 43 millions de dollars américains (57).

Enfin, l'élargissement de la tranche d'âge pour la CPS est demandé par de nombreux programmes nationaux de lutte contre le paludisme. En effet, plusieurs études réalisées au Sénégal (62–64) ont montré une diminution de l'incidence du paludisme dans la tranche 5 – 10 ans, ce qui suggère que les enfants de plus de 5 ans pourraient bénéficier de la CPS (65). L'élargissement de la population cible de la CPS entraînerait une augmentation substantielle de l'administration de SP, avec un risque potentiel d'augmenter la pression de sélection. Beshir *et al.* ont montré que 2 ans après l'intensification de la CPS (tranche d'âge de 3 à 59 mois), dans 6 pays d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale, les fréquences des différentes mutations associées à la résistance de la SP et de l'amodiaquine étaient restées stables (66). De plus, des travaux de modélisation ont montré que la CPS par SP plus amodiaquine conduisait à une propagation lente des parasites résistants à la SP. Cependant, l'augmentation de la population cible de la CPS, passant des enfants âgés de 3 mois à 5 ans, aux enfants âgés de 3 mois à 10 ans, entraînerait un doublement de la vitesse de propagation des parasites résistants à la SP (56).

### 3.3. Les mesures vaccinales

#### a. Chez les enfants

L'OMS recommande la vaccination antipaludique pour la prévention du paludisme à *P. falciparum* chez les enfants vivants dans les zones d'endémie palustre. A ce jour, deux vaccins sont recommandés : RTS,S/AS01 et R21/Matrix-M. Ces vaccins à protéine recombinante contiennent une protéine de fusion constituée d'une région conservée d'une protéine de surface du sporozoïte de *P. falciparum*, la protéine circumsporozoïte, qui est exprimée par le parasite au stade pré-érythrocytaire, combinée à l'antigène de surface de l'hépatite B.

Le RTS,S est composé de la protéine de fusion (protéine circumsporozoïte fusionnée à l'antigène de surface de l'hépatite B) et d'antigène de surface de l'hépatite B non fusionné (22). Une étude pilote de faisabilité, de sécurité et d'impact de la vaccination par RTS,S a débuté en 2019 au Ghana, au Kenya et au Malawi. En 2021, 500 000 enfants avaient reçu 3 doses de ce vaccin. L'administration de 3 doses de RTS,S était associée à une réduction de 32% des admissions à l'hôpital pour un paludisme grave et une réduction de 9% de la mortalité toutes

causes confondues (67). L'OMS recommande depuis 2021 le déploiement à grande échelle de ce vaccin, dont le nom commercial est Mosquirix.

Le deuxième vaccin antipaludique, le R21, est recommandé par l'OMS depuis 2023. Contrairement au RTS,S, le R21 ne contient pas d'antigène de surface de l'hépatite B non fusionné. Pendant l'étude de phase 3, réalisée entre 2021 et 2022, 3 000 enfants ont reçu les vaccinations par le R21. L'efficacité du vaccin était de 75% sur 12 mois dans les zones à transmission saisonnière (23).

Actuellement, le schéma vaccinal consiste en l'administration de quatre doses chez les enfants à partir de 5 mois, avec 3 doses mensuelles et une quatrième dose à distance, pour prolonger la protection. Une cinquième dose peut être administrée, un an après la quatrième dose, dans les zones de forte transmission saisonnière (8).

Afin d'améliorer l'observance et de réduire les contraintes liées aux injections répétées, une méthode d'administration à libération contrôlée de type microcapsules a été développée pour le vaccin antipaludique R21. Les premiers essais murins ont montré une efficacité comparable à celle des injections répétées (68).

L'association de la vaccination saisonnière avec le RTS,S et de la CPS a été évaluée au Burkina Faso et au Mali (69). Les enfants recevaient 3 doses du vaccin RTS,S la première année (à 1 mois d'intervalle), puis une dose annuelle. La chimioprévention par SP et amodiaquine était administrée pendant 4 cycles. Cette combinaison d'approches immunologique et chimiopréventive a permis de réduire considérablement l'incidence du paludisme non compliqué, du paludisme grave et des décès dus au paludisme chez les enfants de moins de 5 ans par rapport à une stratégie de vaccination seule ou de CPS seule. Cette combinaison de la vaccination antipaludique saisonnière avec la CPS est restée bénéfique jusqu'à l'âge de 5 ans (70).

#### **b. Chez les femmes enceintes**

Deux candidats vaccins antipaludiques chez la femme enceinte, PAMVAC (développé par l'Université de Copenhague) et PRIMVAC (développé par l'INSERM), sont en cours d'essais cliniques. Ils dérivent de régions différentes d'une même protéine, var2CSA (71). L'administration aux femmes, d'antigènes dérivés de var2CSA avant leur première grossesse, permet d'induire la production d'anticorps anti-var2CSA similaires à ceux observés chez les femmes multigravides. Ainsi, ces anticorps bloquent l'adhésion des érythrocytes infectés, à la

CSA, au niveau du placenta et préviennent les complications cliniques graves de l'infection à *P. falciparum* pendant la grossesse.

L'essai clinique de phase I chez l'Homme du vaccin PAMVAC a été réalisé en 2016 – 2017 en Allemagne et au Bénin. Ce vaccin s'est révélé être sûr, bien toléré, immunogène (72). Les essais de phase I du vaccin PRIMVAC, réalisés en 2016 – 2017 en France et au Burkina Faso, ont mis en évidence un profil de sécurité acceptable. De plus, toutes les femmes enceintes vaccinées avec PRIMVAC avaient, après 2 doses de vaccin, des anticorps fonctionnels, capables de reconnaître l'antigène var2CSA exprimés à la surface des érythrocytes infectés. Selon l'adjuvant utilisé, ces anticorps étaient toujours retrouvés un an après la dernière injection chez plus de 70% des femmes enceintes (73). Un nouvel essai clinique pour le candidat vaccin PRIMVAC est en cours (ClinicalTrials.gov NCT05426187). Il permettra de suivre, à long terme, le profil immunologique des femmes ayant reçu ce vaccin. Les essais de phase II sont programmés et évalueront, sur une population significativement plus importante, des critères immunologiques supplémentaires et des marqueurs préliminaires d'efficacité.

Ainsi, différentes mesures de prévention sont déployées ou en cours de développement en zone d'endémie. Parmi ces mesures, les traitements préventifs, recommandés par l'OMS chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans, reposent sur la SP, bithérapie de choix pour la prophylaxie.

## II. L'association sulfadoxine – pyriméthamine

L'association SP est, aujourd'hui, utilisée en traitement préventif à travers le TPIg mis en place dans 38 pays, et la CPS déployée dans 19 pays. Elle est également utilisée en traitement curatif, en tant que drogue partenaire de l'artésunate, en Inde (5). Cette bithérapie SP cible deux enzymes impliquées dans la voie des folates.

### 1. Généralités sur les folates

#### 1.1. Historique

Dans les années 1930, Lucy Wills, médecin anglais, étudie l'anémie macrocytaire chez les femmes enceintes à Bombay. Elle montre que cette anémie est plus fréquente dans les populations pauvres dont l'alimentation est limitée en protéines, en fruits et en légumes. Elle met en évidence que ces anémies macrocytaires peuvent se traiter par l'ajout d'extrait de levure ou d'extrait de foie (74). La molécule isolée des feuilles d'épinard par Mitchell *et al.*, a reçu le nom d'acide folique en 1941 (75). Le terme folate dérive du nom « folium » qui signifie feuille en latin. La synthèse et la détermination de la structure de l'acide folique ont, ensuite, été proposées par Angier *et al.*, en 1945 (76). Les réactions biochimiques impliquant les folates comme cofacteurs dans le transfert d'unités monocarbonées, regroupées sous le terme de « métabolisme C1 », ont été élucidées dans les années 1950 – 1960 (77).

#### 1.2. Structure

Le terme « folate » est un terme générique incluant l'acide folique (vitamine B9) et tous les folates naturels. Les folates sont des molécules tripartites composées d'un noyau ptéridine lié par un groupe méthylène à l'acide para-aminobenzoïque (*p*ABA), lui-même fixé à une chaîne de glutamate dont le nombre de résidus d'acide L-glutamique varie de 1 à 14 (78) (figure 7). L'ensemble constitué du noyau ptéridine et du *p*ABA correspond à l'acide ptéroïque. Les folates diffèrent par l'état d'oxydation du cycle ptéridine, la nature du substituant en position N5 et N10, et le nombre de résidus d'acide L-glutamique (79). Les formes actives des folates sont le tétrahydrofolate (THF) et ses dérivés méthylés. Les unités monocarbonées transportées par le THF sont attachées aux positions N5 ou N10.

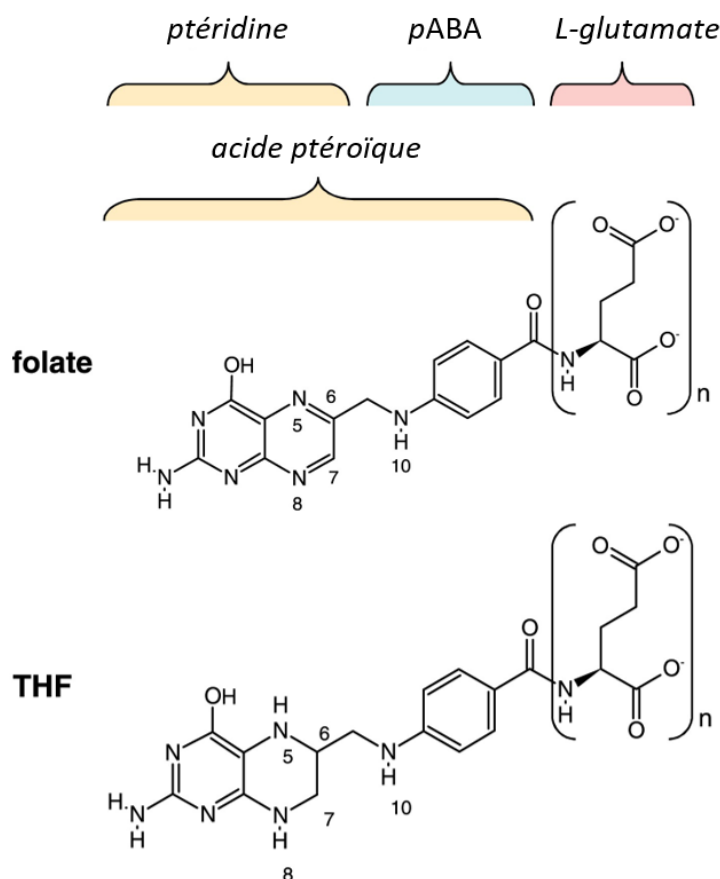


Figure 7 : Structure des folates

Molécules tripartites composées d'un noyau ptéridine lié au pABA, lui-même fixé à une chaîne de résidus d'acide L-glutamique

pABA : acide para-aminobenzoïque ; THF : tétrahydrofolate ;

(adaptée de Müller, 2013)

## 2. Source des folates

### 2.1. Synthèse des folates

Les plantes, les champignons, les levures, la plupart des bactéries et les parasites de l'embranchement des Apicomplexes sont capables de synthétiser *de novo* les folates (80, 81). A l'inverse, les animaux, dont les Hommes, ne possèdent pas toutes les enzymes spécifiques à cette biosynthèse, leur source de folates repose alors sur l'alimentation.

La synthèse *de novo* des folates se déroule à partir de précurseurs simples que sont le guanosine triphosphate (GTP), le pABA et l'acide L-glutamique (78, 81). Le noyau ptéridine est synthétisé

à partir du GTP (figure 8). La GTP cyclohydrolase (GTPC), ou protéine FolE chez les bactéries, permet de cycliser le GTP pour former la dihydronéoptérine triphosphate.

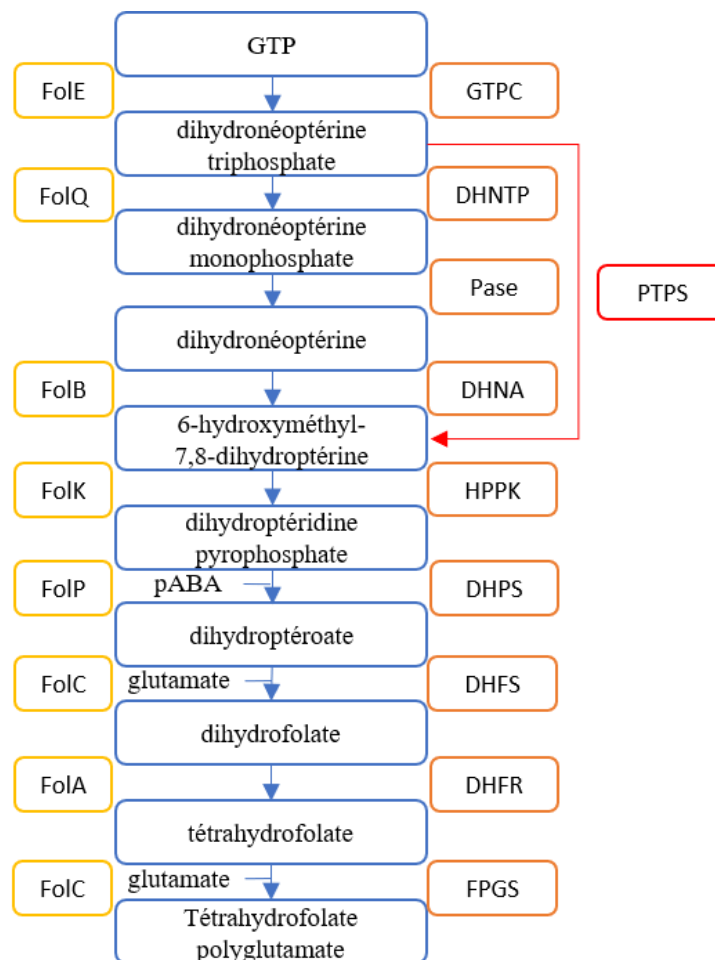


Figure 8 : Biosynthèse des folates

Les enzymes des organismes procaryotes sont représentées en jaune, des eucaryotes en orange et rouge

**DHFR** : dihydrofolate réductase ; **DHFS** : dihydrofolate synthase ; **DHNA** : dihydronéoptérine aldolase ; **DHNTTP** : dihydronéoptérine triphosphate pyrophosphatase ; **DHPS** : dihydroptéroate synthase ; **FPGS** : folylpolyglutamate synthase ; **GTP** : guanosine triphosphate ; **GTPC** : GTP cyclohydrolase ; **HPPK** : 6-hydroxyméthyl-7,8- dihydroptérine pyrophosphokinase ; **pABA** : acide para-aminobenzoïque ; **Pase** : phosphatase ; **PTPS** : pyruvoyl tétrahydroptérine synthase

Puis, le groupe triphosphate est éliminé en deux temps : une dihydronéoptérine triphosphate pyrophosphatase (DHNTTP) permet la formation du dihydronéoptérine monophosphate et une phosphatase non spécifique élimine le dernier phosphate pour obtenir du dihydronéoptérine. La chaîne latérale de la dihydronéoptérine est clivée par la dihydronéoptérine aldolase (DHNA) et permet la formation du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine. La DHNA (ou FolB chez les

bactéries) est une enzyme absente chez *Plasmodium* et chez certaines bactéries des phylums Chloroflexi, Acidobacteria, Firmicutes, Planctomycetes et Spirochaetes (82). La formation du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine est alors médiée par la 6-pyruvoyl tétrahydroptérine synthase (6-PTPS) qui remplace l'action de la DHNTP, de la phosphatase non spécifique et de la DHNA (83).

Le 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine est, ensuite, activé par le transfert d'un pyrophosphate, catalysé par la 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine pyrophosphokinase (HPPK) pour former le dihydroptérine pyrophosphate (DHPPP). La dihydroptéroate synthase (DHPS) permet ensuite la condensation du DHPPP avec le *p*ABA pour former le dihydroptéroate. Chez *Plasmodium* et chez les plantes, ces deux dernières réactions sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle, HPPK-DHPS (84), alors que, chez les bactéries, ces activités sont portées par 2 enzymes distinctes : FolK et FolP. Le dihydroptéroate est, ensuite, converti en dihydrofolate (DHF) par l'addition d'un d'acide L-glutamique par la dihydrofolate synthase (DHFS). Cette enzyme, ainsi que celles impliquées dans les réactions en amont, sont absentes chez les animaux.

La double liaison 5,6 du DHF est réduite par la dihydrofolate réductase (DHFR), en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme donneur d'électrons, ce qui aboutit à la formation du THF. Les plantes supérieures et les protozoaires possèdent une enzyme bifonctionnelle (78, 85) portant les activités DHFR et thymidylate synthase (TS). La réaction synthétisée par la DHPS est fortement inhibée par rétroaction négative du dihydroptéroate, du DHF et du THF (86).

Chez tous les organismes, le THF est sujet à la polyglutamation, par addition séquentielle de résidus d'acide L-glutamique supplémentaires avec des liaisons peptidiques en position gamma, catalysée par la folylpolyglutamate synthase (FPGS) (81). La chaîne de glutamate est essentielle pour retenir les folates dans un compartiment donné. Le cycle du THF est le même chez les bactéries, les champignons, les protozoaires et les animaux.

## 2.2. Synthèse du *p*ABA

Le *p*ABA peut être récupéré ou synthétisé *de novo* à partir de la voie du shikimate, voie qui est présente chez les plantes, les bactéries, les champignons et de nombreux protozoaires, dont les apicomplexes (87, 88). Le remplacement du groupe hydroxyle du chorismate par la fonction amine de la glutamine, permet la formation de l'aminodeoxychorismate (ADC) (figure 9). Cette réaction est catalysée par les enzymes PabA et PabB chez *Escherichia coli*, et par

l'aminodeoxychorismate synthase (ADCS) chez les plantes. L'ADC est, alors, transformé en *p*ABA par l'action d'une ADC lyase (ADCL) ou PabC (89). Chez *Plasmodium*, la synthèse du *p*ABA ne semble pas suffisante pour la survie du parasite *in vivo*. Des études réalisées sur des rongeurs, des singes et des humains, ont montré qu'un régime alimentaire déficient en *p*ABA pouvait aider à protéger l'hôte contre diverses espèces plasmodiales (90–93). L'impact du *p*ABA *in vitro*, sur des cultures de *P. falciparum* sera abordé ultérieurement.

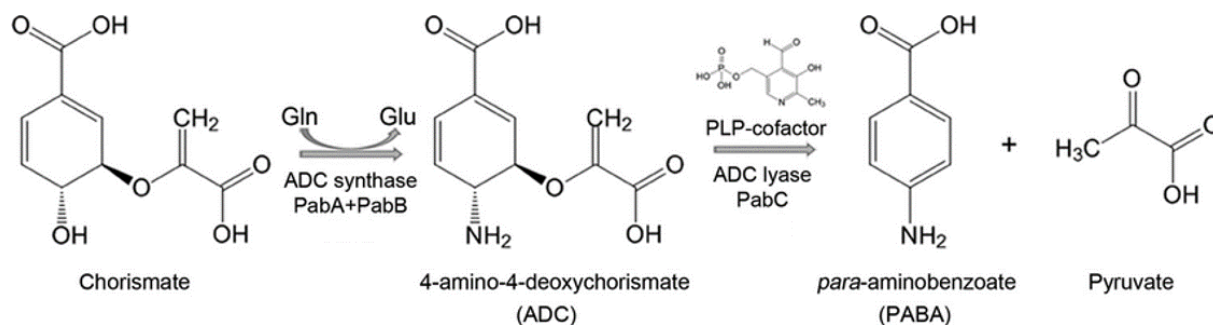


Figure 9 : Conversion du chorismate en acide para-aminobenzoïque

(adaptée de Dai, 2013)

### 2.3. Source exogène des folates

Les animaux sont auxotrophes pour les folates, leur source repose alors sur l'alimentation. Le foie, les légumes verts, les légumineuses, les oranges sont des aliments particulièrement riches en folates. Ces folates alimentaires existent principalement sous forme de polyglutamate et ne peuvent traverser la membrane cellulaire que lorsque la queue de glutamate comporte au maximum trois résidus (94). Chez l'Homme, une carence en folates a de graves conséquences sur la santé et touche de larges populations à travers le monde. Chez la femme enceinte, cette carence peut entraîner, chez le fœtus, des anomalies de fermeture du tube neural dont le spina bifida. Ainsi, une supplémentation en acide folique, à la dose de 0,4 mg/jour, est recommandée au cours du premier trimestre de grossesse (95).

### 2.4. Récupération exogène des folates chez *P. falciparum*

*P. falciparum* possède la capacité de synthétiser *de novo* les folates, mais également de récupérer le folate du plasma de l'hôte ou du milieu de culture (96, 97). Krungkrai *et al.* ont montré que les folates exogènes radioactifs fournis à *P. falciparum* étaient absorbés puis convertis en produits finaux (96). Cette caractéristique de *P. falciparum* d'exploiter ces deux

voies est d'un intérêt considérable pour le parasite mais représente une difficulté pour les expériences en laboratoire, notamment pour l'évaluation des concentrations inhibitrices à 50% (CI50) des antipaludiques qui agissent sur la voie des folates. Des études d'inhibition de l'activité de la *PfDHPS* avec des niveaux élevés de sulfadoxine indiquent que, *in vitro*, le blocage de la biosynthèse du folate peut être contourné par la voie de récupération. Cependant, il existe des différences significatives entre les souches dans l'efficacité avec laquelle le folate récupéré est utilisé. Des travaux de Wang *et al.* ont montré que les lignées HB3 et Dd2 présentent une différence phénotypique importante par rapport à la récupération des folates (98). En présence de fortes concentrations de sulfadoxine, l'ajout de faibles doses d'acide folique à la souche Dd2 permettait de restaurer sa croissance alors que l'ajout de doses importantes d'acide folique à la souche HB3 n'atténuait que légèrement l'inhibition de la croissance, ce qui suggère que cette souche a une capacité moindre à utiliser le folate exogène.

De nombreuses études ont montré que la récupération des folates et des métabolites apparentés à partir du milieu environnant réduit la sensibilité du parasite aux antifolates (97, 99, 100). Il est bien établi que l'ajout de *pABA* et de folate réduisent l'efficacité des traitements par SP dans des modèles de paludisme chez les rongeurs (101), ainsi que, *in vitro*, chez *P. falciparum* (99).

Chez *P. falciparum*, deux transporteurs spécifiques, *PfFT1* et *PfFT2*, interviennent dans la récupération des dérivés et précurseurs du folate (102). Ils sont localisés dans la membrane plasmique et dans les membranes internes des stades intra-érythrocytaires du parasite. Le transporteur *PfFT1*, identifié grâce à la base de données génomique de *P. falciparum*, est également retrouvé chez d'autres protozoaires tel que *Leishmania* (103). Les substrats transportés comprennent l'acide folique, l'acide folinique, le *pABA* et le *pABA* monoglutamate (produit de la dégradation des folates chez les mammifères). Le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-méthyl-THF), forme principale du folate sérique chez l'Homme (104), n'est pas transporté par *PfFT1* et est faiblement transporté via le transporteur *PfFT2*. L'absorption des folates est un processus spécifique, dépendant de l'énergie et saturable, qui peut être inhibé par les inhibiteurs classiques du transport d'anions tels que le probénécide et le furosémide (102, 105). D'autres études ont montré que, chez *P. falciparum*, le probénécide potentialisait l'action des antifolates, *in vitro* (106) et *in vivo* (107).

La relation entre les voies de biosynthèse et les voies de récupération des folates, et leur importance relative pour la viabilité du parasite et la sensibilité aux antifolates reste, à ce jour, mal comprise. Des résultats sur le terrain montrent que, dans les infections humaines, la

récupération des folates ne peut pas, à elle seule, satisfaire aux besoins du parasite (108). Le consensus est que les deux processus sont nécessaires à la croissance du parasite (81, 105).

### 3. Métabolisme des folates

Les folates sont des cofacteurs essentiels à un ensemble de réactions impliquant le transfert d'unités monocarbonées (109), communément appelé métabolisme C1: la conversion de la sérine en glycine, la synthèse *de novo* des purines et de la thymidine, la régénération de la méthionine par reméthylation de l'homocystéine, et le catabolisme de l'histidine (79). Les folates interviennent également indirectement, via la S-adénosyl méthionine (SAM), dans toutes les réactions de méthylation. Seul le THF peut véhiculer des unités C1 sous forme de groupements méthyle, méthylène, et formyle. Ces différentes formes de THF sont interconvertibles.

#### 3.1. La conversion de la sérine en glycine

La conversion de la sérine en glycine est catalysée par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Au cours de cette réaction, le THF est converti en 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5,10-méthylène-THF) (figure 10). Chez *P. falciparum*, deux isoformes de la SHMT ont été identifiées : la *PfSHMTc* cytosolique (110) et la *PfSHMTm* mitochondriale (111). La *PfSHMTm* ne semble pas avoir d'activité enzymatique conventionnelle, mais pourrait néanmoins être impliquée dans une fonction biologique importante, non identifiée à ce jour (111).

#### 3.2. La synthèse *de novo* des purines et pyrimidines

Le 10-formyl-tétrahydrofolate (10-formyl-THF) est impliqué dans la biosynthèse des purines et du formyl-méthionine-ARNt.

Pour la synthèse des nucléotides pyrimidiques, le 5,10-méthylène-THF fournit le groupe méthyle qui permet la conversion, par la thymidylate synthase, du désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP) (81). Ce dernier, sous sa forme triphosphate, est indispensable pour la synthèse d'ADN. Puis, la DHFR permet la réduction du DHF en THF, recyclant ainsi le DHF produit lors de la synthèse du dTMP (112). Ce rôle métabolique essentiel de la DHFR en fait une cible thérapeutique privilégiée. La 5,10-méthylène-THF-réductase (MTHFR) synthétise le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-méthyl-THF) par réduction du 5,10-méthylène-THF, en présence de la flavine adénine dinucléotide (FAD).

### 3.3. La régénération de la méthionine

Le 5-méthyl-THF fournit le groupe méthyle nécessaire à la transformation de l'homocystéine en méthionine, par la méthionine synthase, avec la cobalamine (vitamine B12) comme cofacteur. Un déficit cellulaire en 5-méthyl-THF entraîne une diminution de la synthèse de méthionine et l'accumulation d'homocystéine, ce qui produit alors un stress cellulaire (113). L'homocystéine peut également être reméthylée en méthionine par la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT). Le groupe méthyle est alors fourni par la bêtaïne.

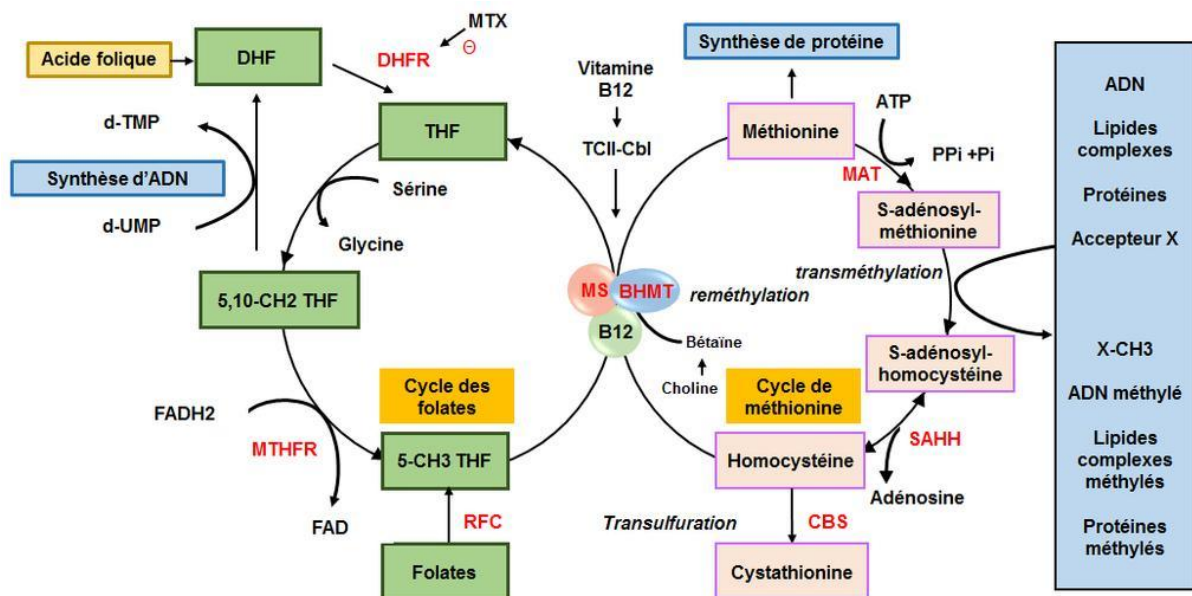


Figure 10 : Le métabolisme des folates

**5-CH<sub>3</sub>-THF** : 5-méthyl-tétrahydrofolate ; **5,10-CH<sub>2</sub>-THF** : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate ;  
**BHMT** : bêtaïne-homocystéine méthyltransférase ; **CBS** : cystathionine bêta-synthase ; **DHF** : dihydrofolate ; **dTMP** : désoxythymidine monophosphate ; **dUMP** : désoxyuridine monophosphate ;  
**FAD** : flavine adénine dinucléotide ; **MAT** : méthionine S-transférase adenosylmethionine ;  
**MTHFR** : 5,10-méthylèneTHF-réductase ; **MS** : méthionine synthase ; **RFC** : reduced folate carrier ;  
**MTX** : méthotrexate ; **SAHH** : S-adénosylhomocystéine hydrolase ; **THF** : tétrahydrofolate

(Chen, 2014)

La méthionine, acide aminé essentiel, est le précurseur immédiat de la SAM, donneur de groupements méthyles dans plusieurs réactions de méthylation, comme l'ADN, l'ARN et la méthylation des protéines (114). La méthylation de l'ADN est un déterminant épigénétique important dans l'expression des gènes, la stabilité, l'intégrité et la réparation de l'ADN (115).

### 3.4. Le catabolisme de l'histidine

Dans les cellules mammifères, l'histidine est métabolisée en acide glutamique. L'acide formiminoglutamique (FIGLU) est un des métabolites intermédiaires de ce catabolisme. La conversion du FIGLU en acide glutamique est catalysée par une enzyme bifonctionnelle, la formiminotransférase-cyclodéaminase et requiert le THF comme cofacteur (79). Ainsi, un test biochimique de carence en folates consistait à mesurer l'excrétion urinaire de FIGLU après une charge en histidine (116).

Chez les plantes, les folates sont également impliqués dans des voies spécifiques telles que la photorespiration ou la biosynthèse des chlorophylles et de la lignine (109).

Chez *Plasmodium*, le métabolisme des folates dans les stades érythrocytaires asexués a été largement étudié. A l'inverse, peu de travaux ont été réalisés sur les stades hépatiques ou dans les formes retrouvées chez le moustique. Le foie chez l'Homme est particulièrement riche en folate et pourrait, en principe, fournir une source importante (112).

## 4. Les inhibiteurs de la voie des folates

Les cellules à division rapide sont dépendantes d'un apport de précurseurs nucléotidiques. Ainsi, les médicaments ciblant le métabolisme du folate sont, depuis longtemps, utilisés comme agents antimicrobiens et anticancéreux très efficaces. Par exemple, les inhibiteurs de la TS sont utilisés comme agents anticancéreux. A ce jour, aucun antipaludique ne cible cette enzyme, hautement conservée par rapport à la TS humaine (112).

Les antifolates utilisés dans le traitement du paludisme se divisent en deux classes : les inhibiteurs de la DHFR et les inhibiteurs de la DHPS. L'association des inhibiteurs de la DHFR et de la DHPS a été montrée comme étant synergique, d'où leur utilisation combinée dans le traitement du paludisme (117). Chez *Plasmodium*, le blocage de la voie des folates entraîne l'épuisement du désoxythymidine triphosphate (dTTP) et une diminution de la synthèse d'ADN, ce qui entraîne la mort du parasite (118). Ce blocage concerne principalement les stades sanguins asexués de *Plasmodium*, durant lesquels la réplication de l'ADN est essentielle. En effet, certains sulfamides, comme par exemple la sulfadiazine, sont, encore aujourd'hui, utilisés pour des applications expérimentales, car ils permettent, en tuant sélectivement les stades sanguins asexués, l'enrichissement en gamétocytes de souris infectées par *Plasmodium yoelli* ou *Plasmodium berghei* (133).

#### 4.1. Les sulfamides, inhibiteurs de la DHPS

Les sulfamides sont des inhibiteurs compétitifs de la DHPS, c'est-à-dire qu'ils se lient au site actif de l'enzyme empêchant alors le substrat d'y accéder. Comme présenté précédemment, cette enzyme n'est pas présente chez l'Homme, ce qui en fait une excellente cible pour les agents anti-infectieux. Les sulfamides ont été largement utilisés dans le traitement des maladies bactériennes ainsi que de nombreuses infections parasitaires impliquant *Pneumocystis*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* et *Plasmodium*.

Les sulfamides constituent la plus ancienne classe d'antibactériens. Avant l'utilisation de la pénicilline, découverte par Fleming en 1928 mais qui ne fut utilisée qu'à partir de 1941, le traitement par les sulfamides était l'outil le plus puissant pour lutter contre les infections bactériennes. Les propriétés antibiotiques du prontosil (chlorydrate de sulfonamido-4 diamino-2', 4' azobenzène) ont été découvertes en 1935, par Gerhard Domagk (119), qui fut récompensé pour ses travaux par le prix Nobel de médecine en 1939. Le prontosil, analogue structural du *pABA*, est une prodrogue. Son métabolite actif est le sulfanilamide (para-aminophényl sulfonamide). Rapidement, son activité antibactérienne a été montrée contre les streptocoques (120) et les mycobactéries (121).

La dapsonne, synthétisée en 1908 (122), et dont l'activité contre *Mycobacterium leprae* a été mise en évidence en 1941 par Faget *et al.*, sera une avancée majeure dans le traitement de la lèpre (123). La dapsonne sera également utilisée pour le traitement de la tuberculose, de la pneumocystose et du paludisme.

L'inhibition compétitive de la DHPS par les sulfamides a été mise en évidence en 1961, par Gene Brown (124). Les sulfamides peuvent être classés selon leur durée d'action. Par exemple, le sulfaméthizole est à action brève, le sulfaméthoxazole a une action intermédiaire, et la sulfadoxine et le sulfaméthoxine sont des sulfamides à action prolongée (125). Les sulfamides sont utilisés pour les propriétés antibiotiques bactériostatiques.

L'efficacité des sulfamides dans le traitement du paludisme a été mise en évidence au début des années 1940, pendant la seconde guerre mondiale, chez des patients infectés par *P. malariae* ou *P. vivax* (126).

Les sulfamides, de par leur homologie importante avec le *pABA*, peuvent se condenser avec le DHPPP et être convertis en sulfa-DHP par la DHPS (figure 11). La formation de ces sulfa-DHP a été observée, pour la première fois, dans les lysats de cellules bactériennes (127, 128), puis, a

été réalisée *in vivo*, dans *E. coli* par Roland *et al.* (129). Cependant, dans leurs travaux, 99% du sulfa-DHP étaient libérés et les niveaux restant à l'intérieur de la bactérie ne contribuaient pas à une inhibition significative de la croissance. Ces sulfa-DHP ont été mis en évidence chez la levure (130). La formation de sulfa-DHP a également été observée pour la dapsons (131). Ces sulfa-DHP interfèrent avec la synthèse du DHF en inhibant d'autres enzymes de la voie des folates, en aval de la DHPS, notamment la DHFS (132). Cette propriété pourrait être mise à profit pour l'étude de nouveaux inhibiteurs basés sur les sulfa-DHP.

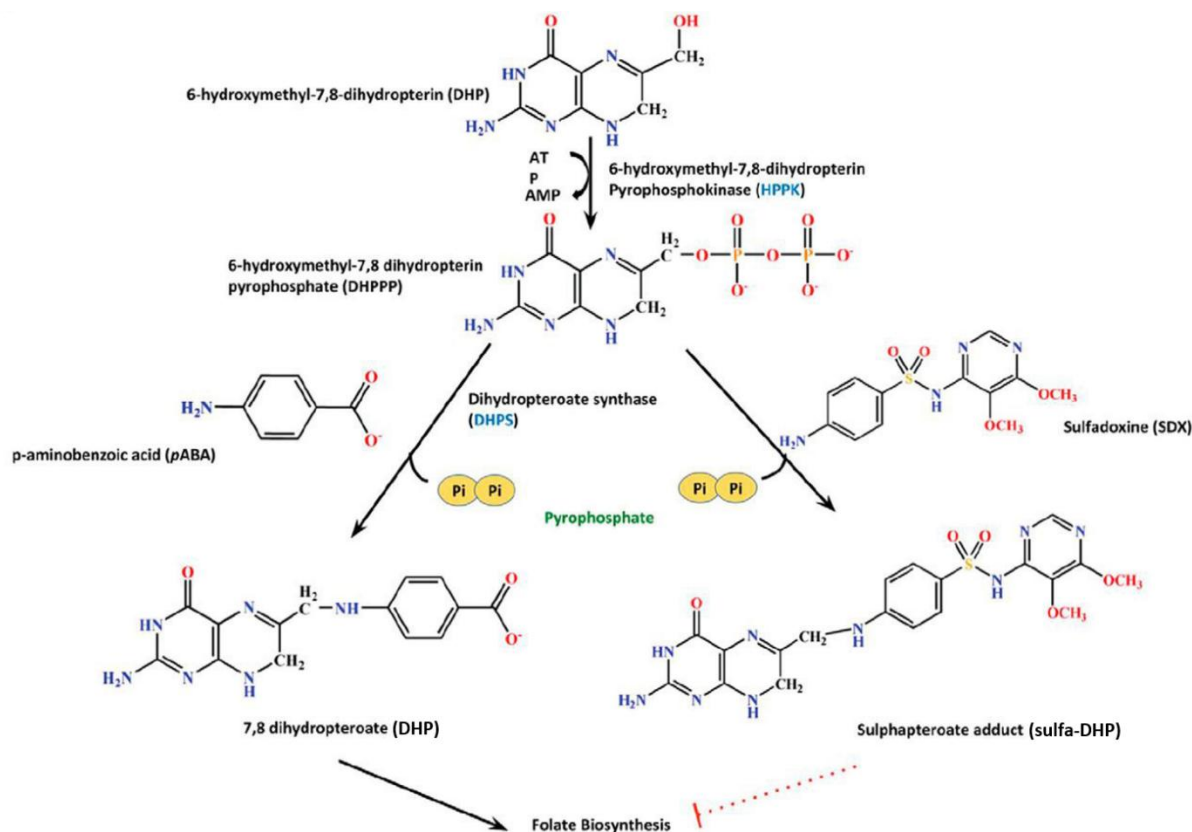


Figure 11 : Fonction de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS

(Yogavel, 2018)

#### 4.2. Les inhibiteurs de la DHFR

Les inhibiteurs de la DHFR sont largement utilisés pour leurs propriétés anticancéreuses (le méthotrexate), antibactériennes (triméthoprime) et anti-protazoaires (pyriméthamine) depuis plusieurs décennies (134).

En recherchant des analogues structuraux de synthèse de l'acide folique, des antagonistes tels que le méthotrexate ont été découverts en 1947 (figure 12) (135). Sidney Farber *et al.* ont

montré au début des années 1950 que le méthotrexate permettait une réduction des symptômes chez les enfants atteints de leucémie aigüe lymphoblastique (136). Quelques années après, le méthotrexate a été utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du psoriasis (137). Actuellement, cette molécule est toujours utilisée dans le traitement des cancers, des leucémies aigües et de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde. Depuis le début des années 2000, de nouveaux inhibiteurs de la DHFR tels que le pémétréxed et le pralatrexate sont utilisés pour leurs propriétés anticancéreuses (138).

Le trimétrexate, structurellement apparenté au méthotrexate, était utilisé pour le traitement de la pneumocystose et de certains cancers. Le triméthoprime, utilisé en association avec le sulfaméthoxazole, est utilisé pour diverses indications d'infections bactériennes, la prophylaxie et le traitement de la pneumocystose (134).

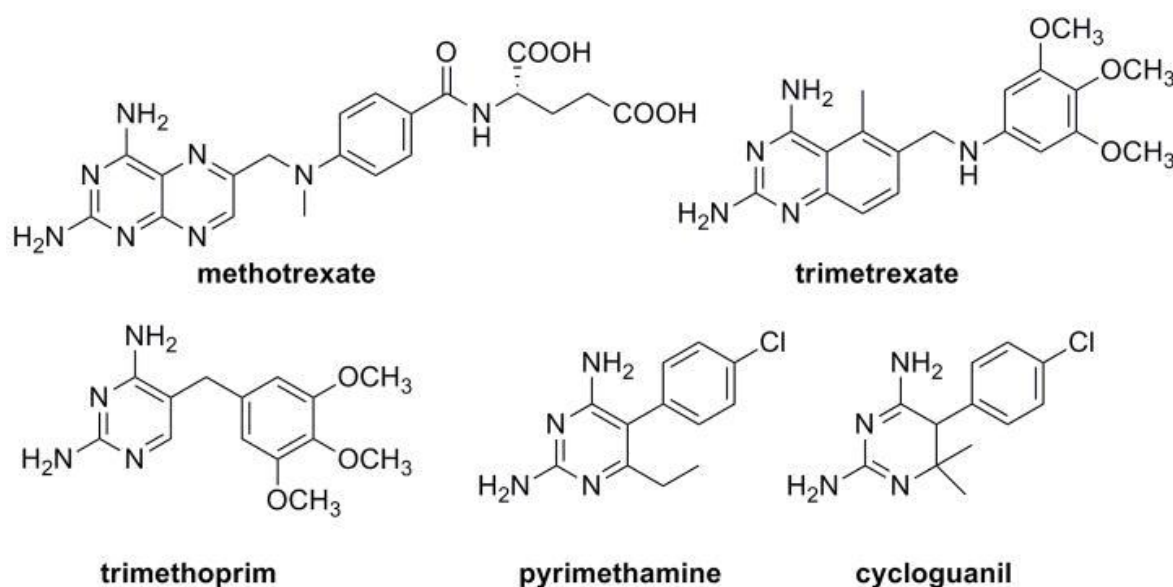


Figure 12 : Les inhibiteurs de la DHFR utilisés en clinique

(Wright, 2012)

La pyriméthamine et le cycloguanil, métabolite du proguanil, sont deux inhibiteurs de la DHFR utilisés pour le traitement du paludisme, en association avec la sulfadoxine et l'atovaquone, respectivement.

Les propriétés thérapeutiques de la pyriméthamine, appartenant à la famille de la 2,4-diaminopyrimidine, ont été découvertes dans les années 1950, par l'équipe de Gertrude Belle Elion (139), qui sera récompensée pour ses travaux par le prix Nobel de médecine en 1988. Le premier essai de traitement du paludisme à *P. falciparum* par pyriméthamine, alors connue sous

le nom de « B.W. 50-63 », a été réalisé en 1951, chez des enfants de 5 à 10 ans, au Nigéria (140). Le proguanil est un biguanide découvert en 1945 (141). Son métabolite actif, le cycloguanil, fut identifié quelques années plus tard, en 1951 (142). L'association atovaquone-proguanil, est toujours utilisée pour le traitement préventif et curatif du paludisme dans les pays développés.

### III. La résistance de *Plasmodium falciparum* à la sulfadoxine - pyriméthamine

Comme tous les antipaludiques, l'association SP est soumise aux problématiques de résistance. En 1965, l'OMS a défini la résistance comme « l'aptitude d'une souche de parasite du paludisme à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de la tolérance du sujet » (143).

Dès le début des années 1950, des cas de résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine en monothérapie ont été rapportés, avec en 1953, en Jamaïque, un cas d'échec thérapeutique d'un accès palustre à *P. falciparum* traité par pyriméthamine aux doses de 25 à 50 mg (144), puis, plusieurs cas de résistance à la pyriméthamine en Afrique de l'Est, après l'administration de traitements prophylactiques mensuels à la dose de 25 mg de pyriméthamine chez les enfants de moins de 5 ans, 50 mg entre 5 et 10 ans, et 100 mg chez les plus de 10 ans (145).

La propagation de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine, dans les années 1960, a entraîné une modification des recommandations concernant le traitement curatif de première intention contre le paludisme, avec la substitution de la chloroquine par la SP, connue sous le nom de Fansidar. En Thaïlande, la SP s'est substituée à la chloroquine comme traitement de première intention du paludisme dès 1973, en prise unique, à la dose de 1000 mg/50 mg de SP. En 1981, en raison d'une diminution de l'efficacité de ce traitement, la posologie a été augmentée à 1500 mg/75 mg. Cependant, des échecs cliniques du traitement par SP ont été signalés entre 1979 et 1981, où seulement 20% des patients recevant 1500 mg/75 mg de SP avaient une parasitémie non détectable à 28 jours (146). La Thaïlande a donc basculé vers une trithérapie méfloquine – SP, en 1983 (147).

De la même manière, au Malawi, suite à l'observation d'échecs thérapeutiques à la chloroquine dès 1983, le traitement de première intention du paludisme a été officiellement modifié par un traitement par SP, en 1992-1993 (147).

En Tanzanie, l'augmentation importante des niveaux de résistance de *P. falciparum* à la SP, avec 82% d'échec à 28 jours chez les enfants symptomatiques (148), a entraîné, en 2006, une modification du traitement de première intention du paludisme non compliqué en substituant la SP par l'artéméter – luméfántrine (149). Cette modification faisait suite aux recommandations de l'OMS à partir de 2001, quant à l'utilisation des CTA pour le traitement du paludisme non compliqué (5).

La SP associée à l'artésunate a été recommandée en traitement première intention pour les accès palustres à *P. falciparum* au Soudan (150) et en Inde (151) à partir de 2004, en Iran en 2007 (152) et au Yémen en 2009 (153). A ce jour, la combinaison SP – artésunate reste utilisée en traitement curatif uniquement en Inde (5).

Actuellement, la SP est principalement utilisée pour les traitements préventifs. Le TPIg par SP a été introduit dans les années 1990, au Malawi (26) et au Kenya (27), et est recommandé par l'OMS en Afrique Sub-saharienne depuis le début des années 2000 (28). Le traitement préventif intermittent du nourrisson (TPIIn) par SP consistait en l'administration de trois doses de SP pendant la première année de vie, au moment des vaccinations systématiques. La première dose de SP était administrée à 8-10 semaines de vie lors de l'injection de la deuxième dose de diphtérie tétanos coqueluche (DTC), la deuxième dose de SP lors de la troisième dose de DTC (12-14 semaines de vie) et la troisième dose de SP au moment de la vaccination contre la rougeole, à 9 mois de vie (154). Le TPIIn a été remplacé par la CPS, recommandée pour la première fois par l'OMS en 2012 (54). Cependant, l'efficacité de la SP dans ces différents programmes de prévention pourraient être menacée par la propagation de la résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine et à la pyriméthamine, due à des mutations ponctuelles des gènes codant pour la *PfDHPS* et la *PfDHFR*, respectivement.

### 1. Les mutations de la *PfDHFR*

L'enzyme *PfDHFR*-TS est codée par le gène *Pfdhfr-ts* situé sur le chromosome 4 de *P. falciparum* (155). En 1987, Bzik *et al.* ont été les premiers à déterminer la séquence d'acides aminés de la *PfDHFR* (156). En 1988, en comparant la séquence de la *PfDHFR* de la souche de *P. falciparum* 3D7 aux souches HB3, 7G8 et à des isolats originaires du Vietnam, de Thaïlande et d'Ouganda, Cowman *et al.* ont mis en évidence les mutations Cys50Arg, Asn51Ile, Ser108Asn/Thr, et Ile164Leu (155). La même année, Peterson *et al.* identifiaient les mutations Ala16Val, Asn51Ile, Cys59Arg et Ser108Asn/Thr en comparant la séquence de la *PfDHFR* de la souche de *P. falciparum* 3D7 à la souche HB3 et à différents isolats obtenus en Asie du Sud-Est, en Afrique et en Amérique du Sud (157). A ce jour, six mutations de la *PfDHFR* sont connues : Ala16Val, Cys50Arg, Asn51Ile, Cys59Arg, Ser108Asn/Thr et Ile164Leu (Tableau 1). La mutation Ala16Ser a été mise en évidence une seule fois, dans un seul isolat pakistanais (158). Les mutations Ala16Val et Ser108Thr sont spécifiques de la résistance au cycloguanil (159).

Tableau 1 : Mutations connues de l'enzyme *PfDHFR*

Codon <i>PfDHFR</i>	Acide aminé sauvage	Acide(s) aminé(s) muté(s)
16	Alanine (Ala)	Valine (Val)
50	Cystéine (Cys)	Arginine (Arg)
51	Asparagine (Asn)	Isoleucine (Ile)
59	Cystéine (Cys)	Arginine (Arg)
108	Sérine (Ser)	Asparagine (Asn) Thréonine (Thr)
164	Isoleucine (Ile)	Leucine (Leu)

Dans la suite de ce travail, les allèles de la *PfDHFR* seront nommés en fonction des acides aminés présents aux positions 50, 51, 59, 108 et 164. Les acides aminés sauvages seront inscrits en lettres majuscules, les acides aminés mutés en lettres minuscules et en gras.

De manière similaire à ce qui a été observé pour la résistance à la chloroquine (160), l'importation de mutations de résistance de la *PfDHFR* en Afrique depuis l'Asie a joué un rôle décisif dans l'établissement de la résistance.

Le triple mutant **CirnI** (Asn51Ile, Cys59Arg, Ser108Asn), originaire d'Asie, était présent en Afrique depuis les années 1980 (161), au Cameroun dès 1985 (162) et au Kenya dès 1988 (163). L'étude des microsatellites flanquant le gène *Pfdhfr* a permis de montrer que ces parasites triple mutant pour la *PfDHFR* avaient le même haplotype microsatellite et donc partageaient une origine commune (161, 164). Le triple mutant **CirnI** est, donc, apparu en Asie du Sud-Est et s'est ensuite propagé en Afrique (164). A l'inverse, le double mutant *PfDHFR* **CiCnI** (Asn51Ile, Ser108Asn) a évolué indépendamment, dans de multiples zones géographiques (164, 165). Cependant, quelques lignées de parasites triple mutant **CirnI** ne partageant pas le même profil microsatellites ont été mis en évidence au Ghana et au Kenya, suggérant ainsi une évolution autochtone de la *PfDHFR* à au moins 2 reprises en Afrique (165). Sur le continent africain, ce triple mutant **CirnI** est largement majoritaire depuis de nombreuses années. Naidoo et Roper montraient que les mutations Asn51Ile, Cys59Arg et Ser108Asn étaient retrouvés dans 75%, 67% et 78% des échantillons collectés dans 24 pays africains entre 2004 et 2008 (166). En 2015 et 2017, en République Démocratique du Congo et au Kenya, le triple mutant **CirnI** était retrouvé dans 87% et 97% des échantillons testés, respectivement (167, 168). En 2020 au Burkina Faso et au Cameroun, 89% et 75% des échantillons testés présentaient cet allèle,

respectivement (169, 170). Le triple mutant **CirnI** est, ainsi, fixé sur le continent africain (figure 13).

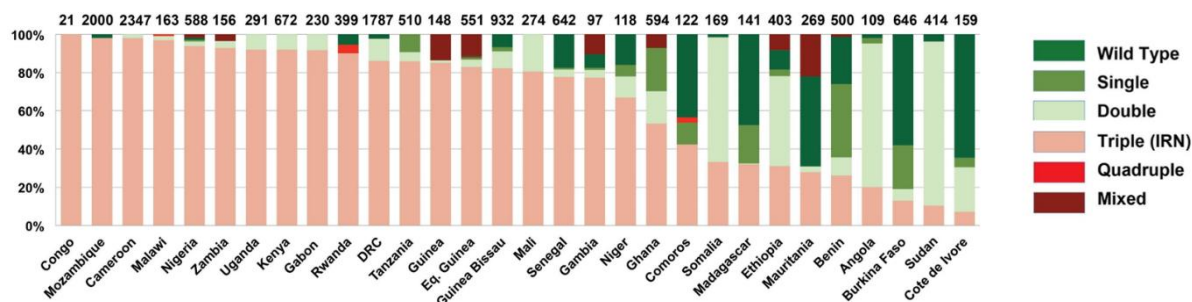


Figure 13 : Fréquence des mutants *PfDHFR* sur le continent africain

Le nombre d'isolats étudiés est indiqué pour chaque pays. Triple IRN : **CirnI** ; quadruple : **CirnL** (Chaturvedi, 2021)

Le quadruple mutant **CirnL** (Asn51Ile, Cys59Arg, Ser108Asn, Ile164Leu) est rarement observé sur le continent africain. Il a été retrouvé au Kenya, à une fréquence de 1% entre 2010 et 2013 (171), au Rwanda, à Ruhuha, avec une fréquence de 8,8% sur des prélèvements de 2015 (172) et au Ghana, dans 12,3% des échantillons de 2016-2018 (173). La mutation Ile164Leu de la *PfDHFR*, bien que très fréquemment recherchée dans les différentes études, n'est actuellement pas retrouvée à des fréquences significatives en Afrique. Une des hypothèses proposées par Lozovsky *et al.* est la perte de fitness induit par la présence du quadruple mutant **CirnL** en l'absence de traitement (174). Le quadruple mutant **CirnL** a été identifié dans les années 2009-2018 en Asie du Sud-Est, en Chine (175), en Inde (176) et au Myanmar (177).

## 2. Les mutations de *PfDHPS*

L'enzyme *PfHPPK-DHPS* est codée par le gène *Pfhppk-dhps* situé sur le chromosome 8 de *P. falciparum* (155). Les premières descriptions des mutations ponctuelles de *Pfdhps* ont été publiées en 1994 (178, 179). Brooks *et al.* ont décrit les mutations Ser436Ala/Phe, Ala437Gly, Ala581Gly et Ala613Ser/Thr à partir d'isolats d'Asie du Sud-Est (Thaïlande, Vietnam et Indochine) et d'Afrique (178).

De nombreux polymorphismes de la sérine en position 436 de la *PfDHPS* ont été décrits. Lors des premières descriptions des mutations de la *PfDHPS*, la mutation Ser436Phe était retrouvée dans les isolats du Vietnam, de l'Indochine et de la Sierra Leone. La mutation Ser436Tyr a été

retrouvée en Côte d'Ivoire sur des échantillons prélevés en 2000 (180). En 2012, Iriemenam *et al* ont décrit la mutation Ser436His, détectée dans 2,3% des échantillons collectés au Kenya entre 2002 et 2008 (181). Actuellement, sur le continent africain, le remplacement d'une sérine par une alanine est la mutation la plus commune en position 436.

La mutation Lys540Asn a, quant à elle, été mise en évidence pour la première fois, sur des échantillons de 2005 sur l'Ile de Car Nicobar en Inde, île la plus touchée par le tsunami de décembre 2004 (182).

La mutation Ile504Thr a été mise en évidence au Kenya, sur des échantillons prélevés entre 2015 et 2018 (183). Des nouvelles mutations de la *PfDHPS*, non étudiées et, à ce jour, sans effet connu sur la sensibilité à la sulfadoxine ont été rapportées par Beshir *et al.* : Gly425Asp, Ile451Met, Ile466Val, Ile470Thr et Asp575Ala (66).

Contrairement à *Plasmodium*, les bactéries ont une deuxième voie de résistance aux sulfamides, grâce aux gènes *sul* généralement portés sur des plasmides. A ce jour, 4 gènes *sul* ont été identifiés (184). Le gène *sul1* a été découvert dès 1975 chez *E. coli* (185) et *Citrobacter sp.* (186), *sul2* en 1980 chez *E. coli* (187), *sul3* en 2003 chez *E. coli* (188) et *sul4* dans une bactérie inconnue présente dans l'eau en 2017 (189).

Tableau 2 : Mutations connues de l'enzyme *PfDHPS*

Codon <i>PfDHFR</i>	Acide aminé sauvage	Acide(s) aminé(s) muté(s)
431	Isoleucine (Ile)	Valine (Val)
		Alanine (Ala)
		Phénylalanine (Phe)
436	Sérine (Ser)	Tyrosine (Tyr)
		Cystéine (Cys)
		Histidine (His)
437	Alanine (Ala)	Glycine (Gly)
540	Lysine (Lys)	Acide glutamique (Glu)
		Asparagine (Asn)
581	Alanine (Ala)	Glycine (Gly)
613	Alanine (Ala)	Sérine (Ser)
		Thréonine (Thr)

Dans la suite de ce travail, les allèles de la *PfDHPS* seront nommés en fonction des acides aminés présents aux positions 431, 436, 437, 540, 581 et 613. Les acides aminés sauvages seront inscrits en lettres majuscules, les acides aminés mutés en lettres minuscules et en gras.

Les mutants *PfDHPS* sont apparus dans les années 1990. L'étude des microsatellites flanquant le gène *Pfdhps* a mis en évidence que ces mutants résistants à la sulfadoxine étaient apparus indépendamment sur plusieurs sites en Afrique (190). En Afrique, 3 lignées distinctes ont été identifiées pour les parasites porteurs de la mutation Ala437Gly, associée ou non à la mutation Ser436Ala (190). La première lignée a été trouvée principalement dans les sites d'Afrique Centrale et du Sud-Ouest (Namibie, Angola, Congo et Gabon), la deuxième lignée dans les sites d'Afrique de l'Ouest (Sénégal, Guinée, Burkina Faso, Ghana et Nigéria) et la troisième lignée a été trouvée principalement au Cameroun (190). Depuis les années 1990, une expansion de la mutation Ala437Gly de *PfDHPS* a été observée sur le continent africain (figure 14). En Guinée Equatoriale, sur des échantillons de 2013-2014, cette mutation était retrouvée dans plus de 90% des échantillons (191).

Sur le continent africain, 2 lignées distinctes ont été identifiées pour les parasites porteurs des mutations Ala437Gly et Lys540Glu. La première lignée a été trouvée dans le Sud-Est de l'Afrique (Afrique du Sud, Tanzanie, Kenya, République Démocratique du Congo et Ouganda), alors que la deuxième lignée a été trouvée dans le Nord-Est de l'Afrique (Ethiopie et Soudan) (190).

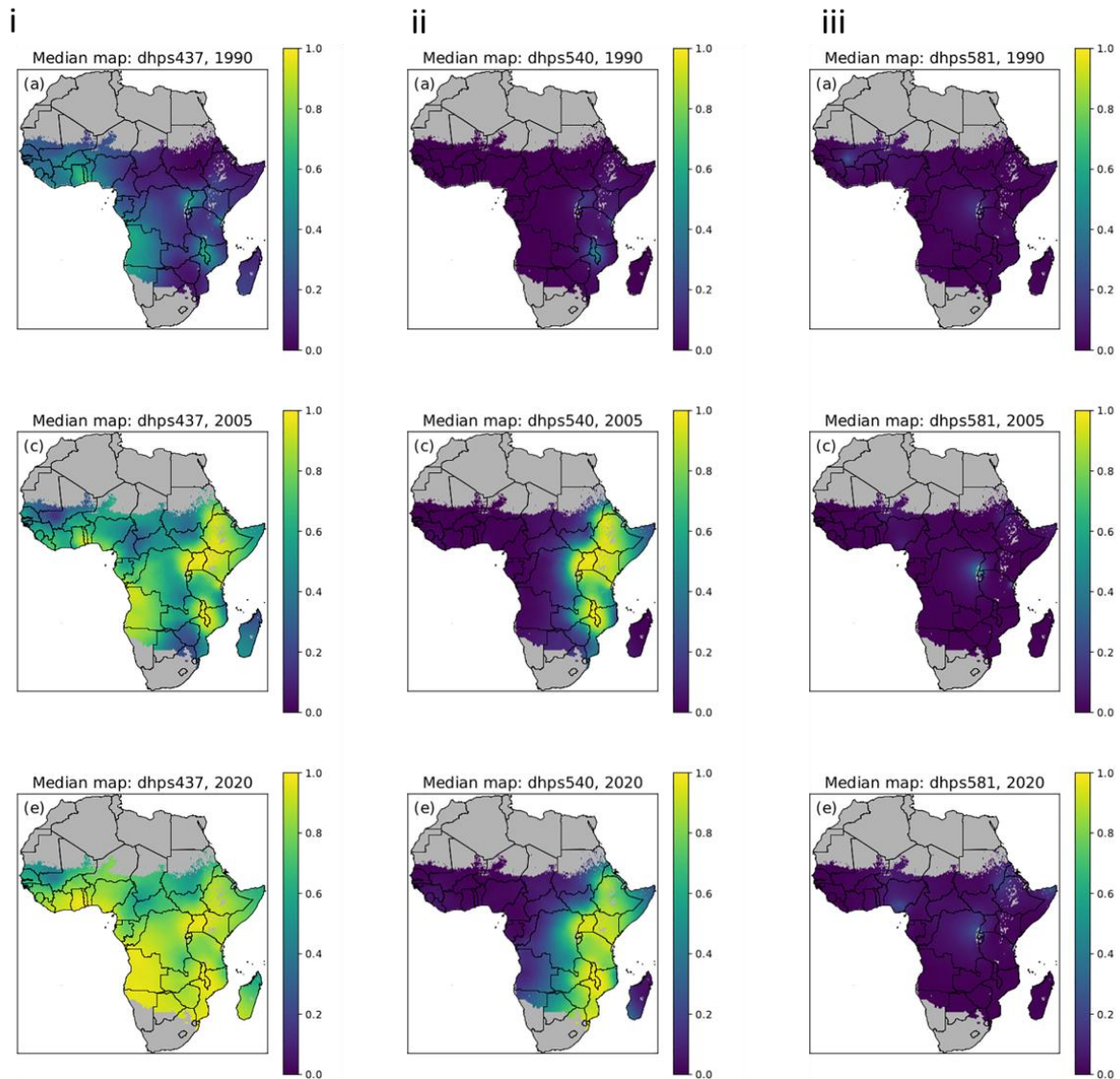


Figure 14 : Evolution spatiotemporelle estimée des mutations (i) Ala437Gly, (ii) Lys540Glu et (iii) Ala581Gly de la PfdHPS

(Adapté de Flegg, 2022)

Le remplacement d'une isoleucine par une valine sur le codon 431 de la PfdHPS est la mutation la plus récemment décrite. Elle fut mise en évidence par Sutherland *et al.* dans des échantillons de 2006 et 2007 provenant du Nigéria. Dans ces isolats, la mutation Ile431Val était décrite en association avec les mutations Ser436Ala et Ala437Gly d'une part (allèle **vagKAA**), et Ser436Ala, Ala437Gly, Ala581Gly et Ala613Ser d'autre part (allèle **vagKgs**) (192). Puis, Chauvin *et al.* ont mis en évidence cette mutation Ile431Val au Cameroun (Yaoundé), dans des échantillons prélevés entre 2010 et 2011 (193). Une étude rétrospective d'échantillons de *P. falciparum* prélevés entre 2003 et 2014 au Nigéria, sur des sites différents, suggère une

augmentation de la fréquence de cette mutation, passant de 0% en 2003 (Ibadan, Nigéria) à 54% en 2014 (Benin City, Nigéria) (194). Il est intéressant de noter que la mutation Ile431Val et la mutation Lys540Glu n'ont, à ce jour, jamais été décrites associées (66).

Enfin, la fréquence de la mutation Ala581Gly a augmenté en Afrique de l'Est, mais également au Nigéria (figure 14), où elle est retrouvée en association avec la mutation Ile431Val dans le quintuple mutant **vagKgs**, en 2010-2014, à une fréquence de 20% (195).

### 3. Les haplotypes de *PfDHFR* et *PfDHPS*

Chez l'Homme, des échecs thérapeutiques après un traitement curatif par SP ont été associés à la présence des mutations de la *PfDHPS* et la *PfDHFR* (196–198). En Ouganda, en 1999, les mutations *PfDHPS* Ala437Gly et Lys540Glu, et *PfDHFR* Cys59Arg étaient associées aux échecs thérapeutiques par SP (198). Au Malawi, à la fin des années 1990, les génotypes des souches de *P. falciparum*, responsables ou non d'échecs thérapeutiques à la SP, ont été comparés. Le triple mutant *PfDHFR* **CirnI** et le double mutant *PfDHPS* **ISgeAA** étaient indépendamment associés à un échec du traitement par la SP. L'haplotype le plus fortement associé à l'échec du traitement par la SP était la combinaison **CirnI / ISgeAA**. A l'inverse, cet haplotype n'était pas associé à un échec du traitement par chlorproguanil – dapsone (199). Au Ghana, en 2002, un échec du traitement par la SP a été observé chez 28% des enfants traités. Le triple mutant **CirnI** de la *PfDHFR* multipliait par 10 le risque d'échec du traitement (200).

La combinaison de l'allèle *PfDHFR* triple mutant **CirnI** et de l'allèle *PfDHPS* simple mutant **ISgKAA** est décrit par Naidoo et Roper comme le génotype « partiellement résistant ». La combinaison de l'allèle **CirnI** et de l'allèle *PfDHPS* double mutant **ISgeAA** est, quant à elle, décrite comme « totalement résistant », et associé à l'échec du traitement curatif du paludisme par la SP. Les génotypes « totalement résistants » ayant acquis une mutation supplémentaire, la mutation *PfDHPS* Ala581Gly ou la mutation *PfDHFR* Ile164Leu, sont décrits comme des « super résistants » (166). Chauvin *et al.* ont décrit pour la première fois, des parasites porteurs de huit mutations, ayant la combinaison *PfDHFR* **CirnI** et *PfDHPS* **vagKgs** (193). Cependant, aucune classification phénotypique de cet haplotype n'est à ce jour disponible.

Des différences régionales sont très marquées pour les prévalences des génotypes de la *PfDHPS*. En Afrique de l'Ouest et du Centre, le génotype « partiellement résistant » (**CirnI / ISgKAA**) est le plus fréquent (166) et les génotypes « totalement résistant » et « super résistant » sont plus rares. En effet, en Guinée Equatoriale, les mutations Lys540Glu et

Ala581Gly étaient retrouvées dans 5% et 0,6% des échantillons de 2013-2014, respectivement (191).

A l'inverse, ces génotypes « totalement résistant » et « super résistant » sont une source de préoccupation importante en Afrique de l'Est. Au Kenya, le génotype « totalement résistant » (**CirniI** / **ISgeAA**) était présent dès la fin des années 1990 (1997-1998) (196). En Tanzanie, une émergence préoccupante du génotype « super résistant » a été observée, avec des fréquences passant de 12 % à 56 % au cours de la période 2003 – 2007 (201). En 2015, 90% des échantillons de *P. falciparum* de Tanzanie étaient porteurs de la mutation Lys540Glu dont 3% possédait le génotype **ISgegA**, avec une disparité importante entre les différents sites (0% à 25%) (202). De la même manière, 75% des échantillons de *P. falciparum* collectés au Soudan en 2015 étaient porteurs de la mutation Lys540Glu de *PfDHPS* et 43% possédait le génotype **ISgegA** (203).

#### 4. Impact des traitements préventifs sur l'évolution des mutations de la *PfDHFR* et *PfDHPS*

Des travaux de modélisation, réalisés dans la région sahélienne, ont montré que la mise en œuvre actuelle de la CPS, à raison de quatre cycles de SP - amodiaquine pour les enfants âgés de 3 mois à 5 ans, avec une couverture initiale de 95 %, entraînait une propagation relativement lente du mutant **CirniI** / **ISgeAA** : plus de 50 ans étaient nécessaires pour passer de la fréquence actuelle au Sahel (estimée à 1%) à 50% (56). Ces travaux ont également montré que l'intensité de transmission du paludisme, le taux de couverture de la CPS, l'accès au traitement curatif et la population cible de la CPS affectaient la propagation du mutant **CirniI** / **ISgeAA**. De plus, le déploiement de cycles supplémentaires de la CPS ou l'élargissement de la population cible aux enfants âgés de 3 mois à 10 ans pouvait accélérer la propagation de ce mutant. En effet, dans un contexte de transmission élevée, l'élargissement de la population cible entraînait une diminution du temps nécessaire pour que le mutant **CirniI** / **ISgeAA** passe d'une fréquence de 1% à 50%, passant alors de 67 ans à 36 ans. Néanmoins, le délai de fixation du mutant **CirniI** / **ISgeAA** restait relativement long. Ce modèle d'étude a, cependant, certaines limites, comme la composition de la population parasitaire. En effet, seuls les haplotypes **CirniI** / **ISgKAA** et **CirniI** / **ISgeAA** étaient représentés.

Les travaux de grande envergure de Beshir *et al.* ont évalué la prévalence de marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* pour la sulfadoxine, la pyriméthamine et l'amodiaquine avant (2015 – 2016) et après (2017 – 2018) la mise en œuvre de la CPS au Burkina Faso, au Tchad, en Guinée, au Mali, au Nigéria, au Niger et en Gambie, chez les enfants

de moins de 5 ans (66). Ainsi, ils ont observé une diminution significative du portage de *P. falciparum* de 2016 à 2018 chez les enfants de moins de 5 ans, sur tous les sites, à l'exception de la Gambie qui avait mis en place la CPS avant 2015 et où le portage était resté faible et stable. Contrairement à l'amodiaquine, les marqueurs moléculaires de résistance à la pyriméthamine (*PfDHFR CirtI*) et la sulfadoxine (*PfDHPS Ile431Val* et *Lys540Glu*) ont vu leurs fréquences augmenter dans les groupes bénéficiant (moins de 5 ans) ou non (10 à 30 ans) de la CPS. La fréquence de l'allèle *PfDHPS vagKgs* était augmentée uniquement dans le groupe ne bénéficiant pas de la CPS. Ces résultats suggéraient que l'allèle *vagKgs* n'était pas sélectionné par la SP plus amodiaquine utilisée pour la CPS.

Les études observationnelles de terrain, en condition réelle, sont les plus pertinentes pour évaluer l'impact de ces prophylaxies. Elles permettent de prendre en compte l'ensemble des paramètres. Cependant, elles sont très lourdes à mettre en place, onéreuses et peuvent être difficiles à interpréter. Pour pallier cela, des méthodes d'évaluations phénotypiques sont indispensables afin de pouvoir déterminer les profils de résistance associés aux différents génotypes de la *PfDHFR* et la *PfDHPS*.

## 5. Evaluation phénotypique des allèles *PfDHFR* et *PfDHPS*

Les phénotypes de résistance associés aux différents génotypes de la *PfDHFR* et de la *PfDHPS* peuvent être évalués par différentes méthodes, complémentaires les unes aux autres. Il est décrit que l'accumulation de mutations de la *PfDHFR* et de la *PfDHPS* augmente progressivement la tolérance du parasite au médicament *in vitro* (118). Ainsi, le niveau de résistance à la SP semble être corrélé au nombre de mutations (98).

### 5.1. Etudes observationnelles sur le terrain

#### a. Méthode de surveillance de l'efficacité des antipaludiques

Le gold standard pour évaluer l'efficacité des antipaludiques est l'évaluation *in vivo* du traitement selon le protocole défini par l'OMS, en 2009 (204). Cette évaluation repose sur un suivi prospectif de la réponse clinique et parasitologique au traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum*. L'OMS recommande la réalisation d'études afin de détecter et mesurer la résistance aux antipaludiques, idéalement tous les 24 mois, dans les mêmes sites sentinelles, classiquement quatre à huit sites. Il est recommandé de choisir ces sites pour représenter les différentes strates épidémiologiques du pays. Dans les zones de forte transmission, seulement les enfants impaludés âgés de 6 à 59 mois sont inclus alors que, dans

les zones de transmission faible à modérée, tous les patients impaludés âgés de plus de 6 mois sont inclus. Le jour de l'inclusion, qui correspond à l'administration de la première dose du traitement, différents éléments tels que la parasitémie, la température axillaire supérieure à 37,5°C, la prise de traitement, la capacité à prendre un traitement par voie orale... sont recueillis. Un suivi de 28 jours (jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28) est recommandé pour les médicaments ayant une demi-vie de moins de 7 jours (chloroquine, amodiaquine ou dérivés de l'artémisinine). Pour les traitements à une demi-vie d'élimination plus longue (SP), une période de suivi de 42 jours (jours 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 et 42) est nécessaire. Bien qu'une période de 42 jours soit optimale pour le suivi d'un traitement par SP, il n'est pas toujours réalisable. En effet, un suivi long augmente le risque de perdre de vue les patients, réduisant ainsi la validité de l'étude et, par conséquent, la capacité à révéler le véritable niveau d'échec. Enfin, des outils moléculaires adaptés doivent être utilisés pour déterminer si les échecs thérapeutiques observés lors de ces études d'efficacité clinique sont causés par une réinfection du patient par un autre clone parasitaire au cours de la période de suivi (nouvelle infection), ou par une recrudescence du parasite initial (échec thérapeutique). Parmi les différentes techniques de génotypages possibles, l'OMS recommande de comparer les profils génétiques de trois gènes parasitaires hautement polymorphes : merozoite surface protein 1 (*mSP1*), merozoite surface protein 2 (*mSP2*) et glutamate rich protein (*glurp*) (205).

Ces études *in vivo* requièrent des moyens humains, techniques et financiers. Elles nécessitent un personnel clinique formé, de disposer d'un laboratoire et d'un microscopiste pour l'examen des frottis sanguins et d'avoir une connaissance du niveau d'intensité de la transmission. De plus, le coût de ces études est important. Enfin, elles sont adaptées à l'évaluation des traitements curatifs pour le paludisme.

#### **b. Impact des génotypes de la *PfDHPS* sur l'efficacité des traitements préventifs par SP**

L'efficacité de la chimioprophylaxie par la SP est modifiée selon l'allèle de la *PfDHPS* circulant. Desai *et al.* ont montré une augmentation du risque d'échec au traitement en fonction du degré de résistance à la SP (206). Le risque d'échec à 42 jours après le traitement était de 1,1%, 10,7% et 21,1% dans les sites à faible (fréquence de *PfDHPS* Lys540Glu inférieure à 50%), moyenne (entre 50% et 90%) et forte résistance (supérieure à 90%), respectivement. De plus, la durée de protection de la SP contre les infections à *P. falciparum* était différente selon le génotype de la *PfDHPS*. Le délai médian de récurrence diminuait avec l'augmentation de la prévalence de la mutation Lys540Glu (figure 15). Il variait de 42 jours au Mali, où la fréquence

de *PfDHPS* Lys540Glu était inférieure à 50%, à 18 jours au Malawi, où elle était supérieure à 90%. Pour les parasites porteurs d'un génotype sauvage de la *PfDHPS* (ISAKAA), la durée de protection était significativement supérieure (durée supérieure à 42 jours) par rapport à la plupart des génotypes mutants (figure 16). La durée de protection estimée était de 30 jours, 16 jours et 12 jours pour les parasites porteurs des allèles ISgKAA, ISgeAA et ISgega, respectivement (207).

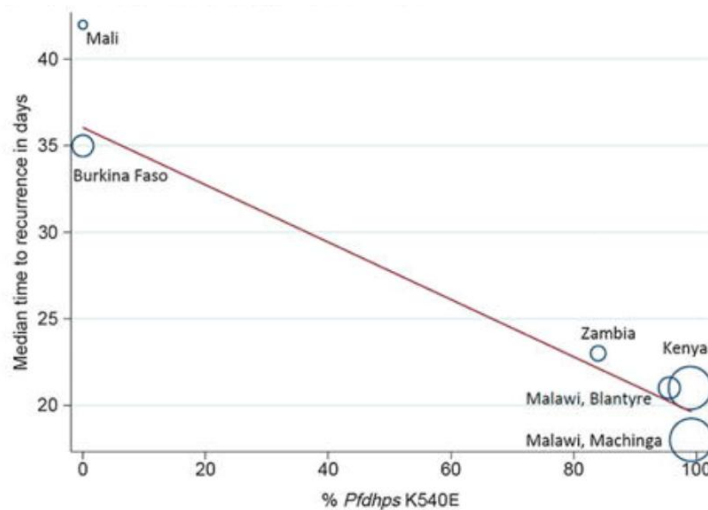


Figure 15 : Délai médian de réinfection après une prise de sulfadoxine – pyriméthamine en fonction de la prévalence de la mutation Lys540Glu de la *PfDHPS*

Les cercles représentent le délai médian estimé de réinfection par *P. falciparum*, la taille du cercle est fonction de la précision de l'estimation.

(Desai, 2016)

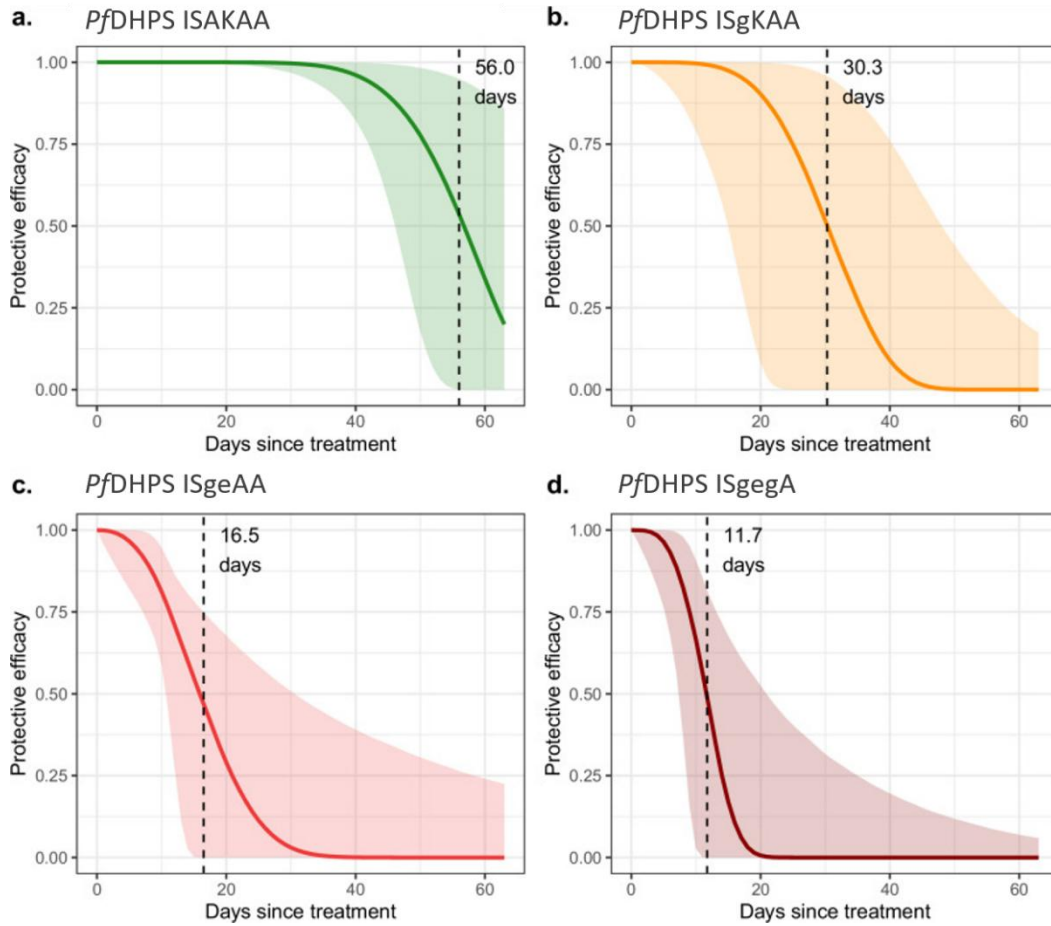


Figure 16 : Probabilité de protection par la SP pour différents génotypes de la PfDHPS

La ligne verticale indique la durée moyenne estimée de la protection fournie par le médicament contre chaque génotype

(adaptée de Mousa, 2025)

Le TPIg par SP présente des bénéfices cliniques substantiels. Il permet notamment la réduction du risque d'anémie maternelle, d'avortement spontané et de faible poids à la naissance. Une étude Cochrane a montré que le poids moyen à la naissance était plus élevé chez les mères ayant bénéficié du TPIg par SP *versus* aucune intervention ou placebo (29). Cependant, le niveau de résistance de *P. falciparum* à la SP pourrait modifier l'effet protecteur de ce traitement préventif. De nombreuses études, de qualité variable, ont évalué l'impact de la résistance à la SP sur l'efficacité du TPIg. L'hétérogénéité importante entre les études pourrait expliquer les résultats contradictoires. Une première revue des travaux réalisés entre 1996 et 2006, a montré qu'au cours des première et deuxième grossesses, l'effet protecteur du TPIg par SP sur le faible poids à la naissance et l'anémie maternelle ne variait pas en fonction du niveau de résistance à la SP. Dans ce travail, le niveau de résistance à la SP était défini comme la proportion d'échecs

thérapeutiques chez les enfants symptomatiques au quatorzième jour. Le TPIg avec 2 doses de SP était associé à une augmentation moyenne de 0,38 g/dl de l'hémoglobine maternelle et de 79 grammes du poids de naissance (208). Une méta-analyse de Muanda *et al.* a conclu que le TPIg par SP ne permettait pas une réduction du faible poids à la naissance dans les régions où la fréquence de la mutation *PfDHPS* Lys540Glu était supérieure à 50% (209). A l'inverse, les travaux de Desai *et al.*, réalisés au Mali, Burkina Faso, Zambie, Malawi, Ouganda et Kenya, chez 6 100 femmes enceintes, ont montré que l'effet protecteur du TPIg par SP sur le risque de faible poids à la naissance n'était pas modifié par la prévalence de la mutation *PfDHPS* Lys540Glu (206). Le TPIg par SP restait associé à une augmentation du poids de naissance et du taux d'hémoglobine maternelle dans les zones où la fréquence de la mutation Lys540Glu était supérieure à 90%.

Une méta-analyse de 9 études réalisée par Chico *et al.* a montré que lorsque la prévalence de la mutation Ala581Gly de la *PfDHPS* était inférieure à 10%, le TPIg par SP avait un effet protecteur sur le faible poids de naissance, indépendamment qu'il s'agisse d'une première grossesse ou non (210). En revanche, lorsque la prévalence de cette mutation était supérieure à 10%, l'effet protecteur de la SP persistait, à des niveaux plus faibles, pour les premières ou deuxièmes grossesses, mais était absent chez les femmes multigravides. Une méta-analyse plus récente, publiée en 2019, a montré que l'efficacité du TPIg par SP était réduite dans les zones où la résistance de *P. falciparum* à la SP est importante (211). En effet, le TPIg par SP, en présence uniquement de la mutation *PfDHPS* Ala437Gly, permettait une réduction de la prévalence du faible poids à la naissance. De plus, il n'y avait pas de corrélation entre la prévalence de la mutation et le risque relatif de faible poids à la naissance. En présence des mutations *PfDHPS* Ala437Gly et Lys540Glu, la protection du TPIg par SP sur le risque de faible poids à la naissance était maintenue, mais une corrélation entre la prévalence de la mutation et le risque relatif de faible poids était retrouvée. Enfin, cette méta-analyse montrait que, dans les zones où la fréquence des mutants IS<sub>g</sub>egA était supérieure à 37%, le TPIg par SP ne permettait plus de réduire la prévalence du faible poids à la naissance.

Une méta-analyse, réalisée sur les données publiées entre 1990 et 2024, a mis en évidence une baisse de l'efficacité du TPIg par SP sur la réduction des accès palustres à l'accouchement avec l'augmentation des niveaux de résistance. Cependant, le TPIg par SP ne présentait aucun effet nocif et restait efficace pour réduire l'insuffisance pondérale à la naissance dans les zones de très forte résistance, définies par une fréquence des mutations Lys540Glu et Ala581Gly supérieure à 60% et 5%, respectivement. Cela suggère un mécanisme potentiellement non lié à

l'effet antipaludique de la SP, qui serait bénéfique pour la croissance fœtale et la santé maternelle, et qui persisterait malgré une efficacité antipaludique compromise (212).

D'anciennes recommandations de l'OMS préconisaient de ne plus mettre en œuvre le TPI<sub>n</sub> par SP dans les régions où la fréquence des mutations Lys540Glu étaient supérieure à 50% (213). De même, l'OMS préconisait de ne plus administrer le TPI<sub>g</sub> par SP dans les régions où la fréquence des mutations Lys540Glu et Ala581Gly étaient supérieures à 95% et 10%, respectivement (214). Cette recommandation n'est, à ce jour, plus d'actualité. En effet, selon l'OMS, bien que l'efficacité du TPI<sub>g</sub> par SP pour éliminer les infections palustres existantes ou pour prévenir des nouvelles infections soit compromise dans les zones de résistance élevée, le TPI<sub>g</sub> par SP permet, néanmoins, la réduction du faible poids à la naissance ou l'anémie maternelle (8).

Une étude chez la souris montrait qu'un traitement médicamenteux par pyriméthamine éliminant les parasites murins sensibles, permettait aux parasites résistants de croître jusqu'à une densité étonnamment élevée lors d'infections mixtes. Ce phénomène, appelé « facilitation compétitive », peut alors accélérer considérablement la vitesse à laquelle les parasites résistants se propagent dans une population (215). Des travaux de Harrington *et al.* réalisés en Tanzanie, où les fréquences des mutations Lys540Glu et Ala581Gly étaient élevées, suggéraient que le TPI<sub>g</sub> par SP potentialisait l'inflammation placentaire (216). L'utilisation du TPI<sub>g</sub> par SP était associée à une augmentation de la parasitémie, ce qui évoquait une meilleure croissance des parasites en présence de SP. Ainsi, le TPI<sub>g</sub> par SP, dans les zones où la fréquence de la mutation Ala581Gly était élevée, pourrait être nocif aux femmes enceintes et à leur nouveau-né. Ces résultats n'ont pas été confirmés par des études ultérieures. Une autre étude menée au Malawi entre 2009 et 2011 a montré que l'utilisation du TPI<sub>g</sub> par SP n'entraînait pas d'inflammation placentaire plus importante chez les femmes infectées par les parasites porteurs de l'allèle IS<sub>gegA</sub> de *PfDHPS* (217).

Alors que différents essais contrôlés randomisés (218–221) ont rapporté des efficacités protectrices contre les épisodes cliniques de paludisme et l'anémie, le TPI<sub>n</sub> par SP, chez des nourrissons âgés 8 à 16 semaines, de 2004 à 2008, en Tanzanie, dans une zone de forte résistance à la SP, n'avait pas d'effet significatif sur l'incidence du paludisme, l'anémie, les admissions à l'hôpital pour cause de paludisme et la mortalité (222).

Ainsi, il existe des inquiétudes concernant la diminution de l'efficacité protectrice de la SP pour les TPI<sub>g</sub> et la SMC dans les régions où les génotypes « totalement résistant » et « super

résistant » sont fréquents. En l'absence d'alternatives et en raison des bénéfices persistants du TPIg par SP sur la croissance foetale et la santé maternelle (212), le TPIg par SP reste, à ce jour, recommandé, indépendamment de la fréquence des différentes mutations de la *PfDHFR* et *PfDHPS*.

Pour évaluer l'efficacité de la SMC, les marqueurs moléculaires de la résistance à l'amodiaquine, tels que les mutations du gène du transporteur de la chloroquine (*PfCRT*) et du gène de multirésistance 1 (*PfMDR1*) doivent également être considérés, même si les corrélations ne sont pas absolues (223).

## 5.2. Infections expérimentales

Les espèces murines de *Plasmodium* sont nombreuses et différentes de celles retrouvées en pathologie humaine. Nous pouvons citer par exemple, *Plasmodium berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelli*, *P. vinckei*...

Des infections expérimentales de souris, avec différentes espèces murines de *Plasmodium*, ont été développées et permettent l'étude de la physiopathologie du paludisme et des mécanismes immunitaires mis en jeu par l'hôte, ou encore l'évaluation *in vivo* de l'efficacité et de la sécurité des nouvelles molécules développées pour le traitement du paludisme. Cependant, l'évaluation phénotypique d'un génotype de résistance peut être plus délicate dans la mesure où les espèces plasmodiales sont différentes, sans forcément d'homologie génique.

*P. falciparum* est une espèce qui ne peut pas infecter les rongeurs, à l'exception des souris humanisées, telles que le modèle *P. falciparum*-NOD/SCID IL-2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> greffé avec des érythrocytes humains (224). Ces modèles humanisés sont intéressants mais sont coûteux et difficiles à mettre en œuvre. Ils présentent également une faible reproductibilité inter-animaux et ne sont donc pas adaptés à l'évaluation de nombreux génotypes différents.

### a. Evaluation de la résistance à la pyriméthamine

L'utilisation d'un *Plasmodium berghei* transgénique, dont l'enzyme DHFR a été remplacée par celle de *P. falciparum*, a permis de montrer que le quadruple mutant **CirnL** permettait un développement du parasite chez le moustique et chez l'hôte intermédiaire au stade hépatique et conférait une résistance complète à la pyriméthamine utilisée comme traitement curatif (229) ou préventif (230).

## b. Evaluation de la résistance à la sulfadoxine

Pour l'évaluation de la résistance à la sulfadoxine, il n'a pas été décrit, à ce jour, de modèle de *Plasmodium* murin transgénique, dont l'enzyme DHPS aurait été remplacée par celle de *P. falciparum*. Un modèle d'édition génique dirigée par CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a été développé par Yamauchi *et al.* (231). Dans ce modèle, l'utilisation de *P. berghei* transgénique, porteur de la mutation équivalente à la mutation Ala437Gly de la *PfDHPS*, a permis de mettre en évidence que le parasite mutant était résistant à la sulfadoxine. Cependant, cette résistance ne s'accompagnait pas de modification du fitness ni chez l'hôte intermédiaire (en l'absence de drogue, croissance et production de gamétocytes similaires), ni chez l'hôte définitif (en l'absence de drogue, production d'oocystes similaire au génotype sauvage chez le moustique). Cette absence d'impact sur le fitness pourrait expliquer la forte prévalence de la mutation *PfDHPS* Ala437Gly.

Un modèle de souris infectées par *P. berghei* sauvage, et traitées par sulfadoxine a également montré que la prise de SP augmentait la production de gamétocytes (232), en agissant spécifiquement sur les formes érythrocytaires asexuées, ce qui favoriserait la transmission. Cette augmentation de la gamétocytémie a également été observée pour *P. falciparum*, chez des femmes enceintes sous TPIg par SP (233, 234).

### 5.3. Evaluation phénotypique *in vitro*

Les tests de sensibilité *in vitro* sont indispensables pour élucider le mode d'action des antipaludiques et évaluer le phénotype de susceptibilité. Ils sont très utiles pour évaluer l'efficacité d'un traitement curatif, mais la surveillance de l'efficacité d'un traitement préventif est plus délicate (235).

Différents paramètres peuvent être mesurés pour évaluer l'action d'un inhibiteur.

#### a. Paramètres *in vitro* mesurables

##### Evaluation de la croissance

Dans les modèles *in vitro*, il est possible de déterminer de la concentration inhibitrice à 50% (CI50) d'une molécule. Elle correspond à la concentration de cette molécule nécessaire pour inhiber de moitié un processus biologique donné, c'est-à-dire, dans ce cas, diminuer de 50% la croissance parasitaire. Ainsi, l'activité antiplasmodiale d'une molécule peut être déterminée, *in vitro*, par la mesure directe de la CI50 sur des cultures de *P. falciparum*. Les méthodes de

détermination reposent sur l'incorporation d'un agent isotopique tel que l'hypoxanthine tritiée, ou l'intercalation dans l'ADN d'un agent fluorescent tel que le SYBR Green.

L'activité inhibitrice d'une molécule peut également être déterminée par mesure de la CI50 sur des bactéries (*E. coli*) ou levures (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimant la protéine plasmodiale cible.

### **Paramètres cinétiques**

La détermination *in vitro* des paramètres enzymatiques nécessite que la protéine d'intérêt soit isolée, sous forme fonctionnelle et en quantité suffisante. Pour ce faire, l'expression hétérologue est le plus souvent utilisée (236). Le gène codant pour l'enzyme est cloné dans un plasmide, qui peut être inductible. Les protéines plasmodiales de *P. falciparum* peuvent être difficile à exprimer en raison du génome particulièrement riche en adénine et thymine, de l'ordre de 80% (237), et de la présence de régions riches en répétition. L'organisme hôte privilégié est la bactérie *E. coli*, en raison du faible coût, de la rapidité, et de la facilité d'utilisation et de manipulation génétique. L'hôte peut être un organisme eucaryote tel qu'une levure (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) (236, 238). Des systèmes acellulaires de germe de blé ont également été décrits pour l'expression de protéines plasmodiales (239, 240).

Le  $K_m$ , ou constante de Michaelis (241), est une caractéristique de l'enzyme et correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est à la moitié de la vitesse maximale. Le  $K_m$  est indépendant de la quantité d'enzyme et traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Il est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat : un  $K_m$  faible traduit une affinité élevée.

Les inhibiteurs bloquent l'activité enzymatique en ralentissant ou en interrompant la réaction chimique. La perte d'activité provoquée peut être temporaire ou permanente. L'inhibition enzymatique peut être compétitive, incompétitive, non compétitive ou mixte. Lorsque l'inhibition est compétitive, les structures du substrat et de l'inhibiteur sont proches, ils partagent alors le même site de liaison et entrent en compétition pour y accéder. Lorsque l'inhibiteur compétitif se lie au site actif de l'enzyme, il empêche temporairement le substrat de s'y fixer. Cette inhibition compétitive peut être levée en augmentant la concentration de substrat. A l'inverse, lorsque l'inhibition est non compétitive, les sites de liaison du substrat et de l'inhibiteur sont différents. Le substrat peut se lier à son site lorsque l'inhibiteur est lié, mais l'activité de l'enzyme est alors diminuée. Enfin, un inhibiteur incompétitif est un inhibiteur qui se lie au complexe enzyme-substrat pour former un complexe improductif (242).

L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est mesurée par sa constante d'inhibition ( $K_i$ ). Il s'agit d'une constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur. Elle correspond à la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques est occupée. Ainsi, plus le  $K_i$  est petit, plus l'affinité d'un inhibiteur est grande (242).

### b. Evaluation de la résistance à la pyriméthamine

Dès 1996, la transformation de souches de *P. falciparum* sauvage pour la *PfDHFR* avec des plasmides portant différentes formes mutantes de la *PfDHFR* a permis de mettre en évidence une augmentation de la CI50 de la pyriméthamine, confirmant ainsi l'implication des mutations de cette enzyme dans la résistance à la pyriméthamine. Par rapport à la *PfDHFR* sauvage, la mutation Ser108Asn (CNCnI) et le triple mutant CirnI entraînaient une augmentation de la CI50 d'un facteur 100 et 1600, respectivement (243).

Yuvaniyama *et al.* (244) ont montré que lorsque l'enzyme *PfDHFR* portait les mutations Cys59Arg et Ser108Asn (CNrnI), le  $K_i$  pour la pyriméthamine était 50 fois plus élevé et la CI50 multipliée par un facteur de 375, par rapport aux valeurs obtenues avec l'enzyme sauvage. La présence de quatre mutations, Asn51Ile, Cys59Arg, Ser108Asn et Ile164Leu (CirnL), sur la *PfDHFR* diminue sa capacité de liaison avec la pyriméthamine qui se traduit par une augmentation du  $K_i$  et de la CI50, d'un facteur supérieur à 1000 comparativement à la forme sauvage de *PfDHFR*, et à une augmentation de la résistance à la pyriméthamine (244).

Grâce à un modèle bactérien de *E. coli* où les séquences codantes de la *PfDHFR* étaient insérées et l'enzyme bactérienne endogène inhibée sélectivement par le triméthoprim, Lozovsky *et al.* ont évalué le niveau de résistance des différents allèles de la *PfDHFR* par mesure de la CI50 (174). Comparativement à la forme sauvage de la *PfDHFR*, les CI50 de la pyriméthamine pour les allèles CirnI et CirnL étaient augmentées d'un facteur de 720 et 1110, respectivement. Les parasites quadruples mutants CirnL présentaient le degré de résistance le plus élevé à la pyriméthamine.

L'utilisation du triméthoprim pour inhiber la fonction DHFR de *E. coli* peut d'une part, entraîner une inhibition incomplète et d'autre part, interférer avec la *PfDHFR* (245). Récemment, un nouveau modèle bactérien, indépendant de l'ajout de triméthoprim pour supprimer la fonction DHFR de *E. coli*, a été utilisé (246). Les gènes bactériens codant pour la DHFR et la TS ont été inactivés. Les valeurs de CI50 obtenues avec ce modèle bactérien étaient fortement corrélées aux valeurs de CI50 obtenues sur des cultures de *P. falciparum*, ce qui en fait un test fiable pour le criblage de nouveaux inhibiteurs de la *PfDHFR*.

Bates *et al.* ont utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* dépourvue d'activité DHFR endogène, pour intégrer la *Pf*DHFR et déterminer les CI50 de la pyriméthamine (247). Dans ce système, la CI50 des parasites quadruples mutants **CirnL** était si élevée, qu'elle n'a pas pu être déterminée.

### c. Evaluation de la résistance à la sulfadoxine

La détermination de la CI50 de la sulfadoxine sur des souches de *P. falciparum* est, à ce-jour, difficilement réalisable de manière fiable. Contrairement à d'autres antipaludiques, la détermination de la CI50 de la sulfadoxine est caractérisée par une variabilité importante et un manque de reproductibilité (248). De nombreux paramètres entraînent des modifications substantielles des valeurs expérimentales de la CI50.

Tout d'abord, la présence de *p*ABA dans le milieu de culture peut antagoniser l'action de la sulfadoxine. L'ajout de *p*ABA dans le milieu de culture, à des concentrations de 11 nM et 38 nM a entraîné une augmentation de la CI50 à la sulfadoxine, passant de 22 nM en l'absence de *p*ABA à 38 nM et 130 nM, respectivement (97). Il est bien établi que l'évaluation de la résistance à la sulfadoxine par des tests *in vitro* doit être réalisée avec un milieu de culture appauvri en *p*ABA. Cependant, malgré l'utilisation de milieux de culture dépourvus de *p*ABA, la détermination de la CI50 de la sulfadoxine reste variable, allant de 10 nM (249), 150 nM (250), 1 µM (117), à plus de 3 mM (251) pour des souches de *P. falciparum* considérées comme sensibles à la sulfadoxine.

La présence d'acide folique dans le milieu de culture pose également problème. En effet, l'ajout de 11 nM d'acide folique a entraîné une augmentation de la valeur de la CI50 de la sulfadoxine d'environ 60 fois, passant d'une valeur de CI50 de 22 nM en absence d'acide folique, à plus de 1,3 µM (97).

De même, le sérum humain, nécessaire à la croissance du parasite en culture, est composé de résidus de *p*ABA et de folates, à concentrations variables. Dans une étude portant sur des sérums de donneurs de sang, les concentrations sériques de *p*ABA étaient comprises entre 0,1 µM et 6,1 µM (251). Cette variabilité contribue à la faible reproductibilité des tests *in vitro*. Ainsi, certains auteurs ont eu recours à de la dialyse, pendant plusieurs heures, pour éliminer ces molécules du sérum. Cependant, ce sérum dialysé, associé à un milieu de culture dépourvu en *p*ABA et en acide folique, ne permettait pas la croissance de toutes les souches de *P. falciparum* (100, 249). Pour pallier cela, de faibles concentrations de *p*ABA ou d'acide folique étaient introduits dans le milieu de culture afin d'assurer une croissance minimale de

*P. falciparum* (100). Wang *et al.* (248) ont proposé un test dans lequel aucun sérum n'est utilisé, celui-ci étant remplacé par de l'albumine sérique bovine purifiée par chromatographie et riche en lipides.

Des différences majeures ont également été observées en fonction des érythrocytes utilisés, provenant de différents donneurs de sang (248). Pour une même souche de *P. falciparum* (Dd2), la CI50 pouvait être multipliée d'un facteur 6 selon les érythrocytes utilisés (figure 17). Wang *et al.* (248) proposaient d'utiliser les érythrocytes d'un seul et même donneur de sang, prélevé à un intervalle régulier (3 à 4 semaines) afin d'obtenir des résultats plus reproductibles. La culture de *P. falciparum* en amont du test de sensibilité joue également un rôle majeur. Dès les années 1985, il avait été proposé de réaliser la culture des parasites dans un milieu appauvri en folate et en *pABA* (251). Cependant, une réduction trop importante des concentrations de folate et de *pABA* entraînait la mort ou une croissance très lente de certaines souches de *P. falciparum*. Wang *et al.* (248) ont recommandé une période d'adaptation, de quelques jours à plusieurs mois, dans un milieu contenant de faibles concentrations de folate et une absence de *pABA*, préalable à l'utilisation d'un milieu totalement dépourvu de folate et de *pABA*, 48h avant le test.

Enfin, la limite de solubilité de la sulfadoxine en solution aqueuse, proche du mM peut être un facteur limitant (97).

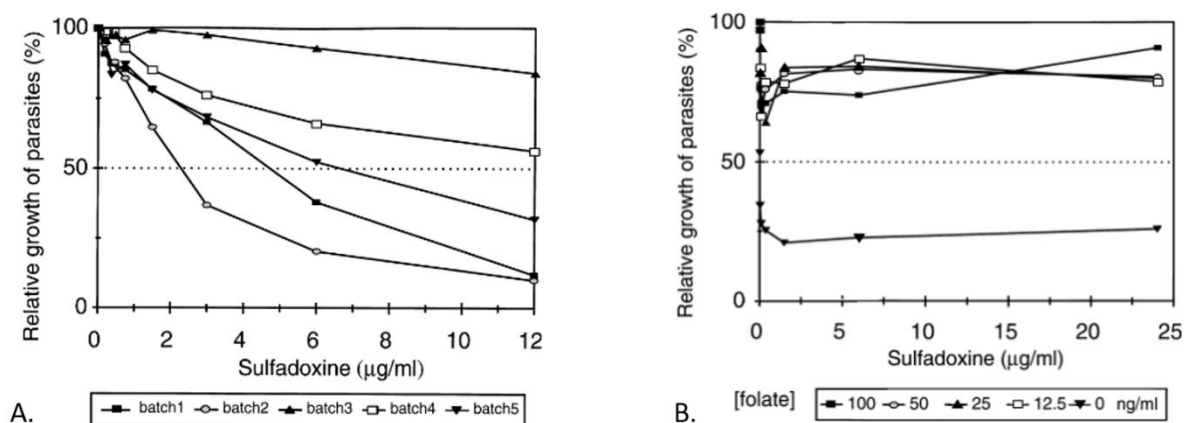


Figure 17 : Variabilité de la détermination de la CI50 à la sulfadoxine, pour une même souche de *Plasmodium falciparum* (Dd2)

Variabilité selon (A) les érythrocytes utilisés et (B) la concentration en folate dans le milieu de culture  
(Wang, 1997)

Ainsi, l'évaluation du phénotype de résistance des souches de *P. falciparum* à la sulfadoxine, par détermination de la CI50, n'est, à ce jour, pas réalisable du fait du manque de répétabilité et reproductibilité.

Un modèle bactérien d'*E. coli* dépourvue de DHPS endogène a permis d'évaluer l'impact des mutations à travers la croissance bactérienne en présence de sulfadoxine. La croissance de la souche comportant l'allèle *PfDHPS* sauvage était fortement inhibée par la sulfadoxine alors que les souches contenant les allèles mutants **ISgKAA**, **ISgeAA**, **ISgKgA**, **IfgKAs** et **IfgKAt** pouvaient croître, indiquant que les mutations Ser436Phe, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly ou Ala613Ser/Thr confèrent une résistance à la sulfadoxine (252).

De la même manière, la mesure de la CI50 dans un modèle d'*E. coli* transformé a permis à Lumb et Sharma de mettre en évidence que la mutation Lys540Asn de la *PfDHPS* conférait un niveau de résistance à la sulfadoxine inférieur à celui conféré par la mutation Lys540Glu (253).

L'expression hétérologue, dans *E. coli*, des différents allèles de l'enzyme *PfDHPS*, a également permis la comparaison des paramètres cinétiques tels que l'affinité de liaison de l'enzyme pour le *pABA*, déterminée par la mesure du  $K_m$ , et le pouvoir d'inhibition des sulfamides, déterminé par la mesure du  $K_i$ .

Ainsi, des valeurs de  $K_m$  inférieures à celle de la *PfDHPS* sauvage ont été obtenues pour les mutants **ISgKAA**, **IagKAA**, **ISgeAA** et **IfaKAs** (254). L'efficacité catalytique de ces enzymes mutantes étaient alors augmentée, par exemple d'un facteur 6 pour l'enzyme **ISgKAA**. La résistance à la sulfadoxine résulte alors, pour une part, d'une augmentation de l'activité des enzymes *PfDHPS* mutantes.

Les méthodes *in vitro* d'évaluation de la résistance par mesure du  $K_i$  ont, cependant, montré des limites. En effet, même si certains auteurs ont montré que le  $K_i$  de la sulfadoxine pour les allèles **IfaKAt** ou **ISAKgA** de *PfDHPS* était nettement augmenté (116, 246), d'autres travaux mettaient en évidence que le  $K_i$  de la sulfadoxine n'était pas modifié malgré la présence de mutations telles que *PfDHPS* Ala437Gly (246). Cette similarité de  $K_i$  de la sulfadoxine pour l'enzyme sauvage ou mutante **ISgKAA** est surprenante car la mutation Ala437Gly de la *PfDHPS* est une mutation connue pour entraîner une résistance de *P. falciparum* à la sulfadoxine.

La mutation Ala437Gly entraîne une affinité accrue pour le *pABA* (254). Les mutations de résistance qui donnent lieu à une affinité plus élevée pour les substrats sont relativement rares.

Cela a, par exemple, été observé pour un mutant DHFR de *E. coli* (255) ou des mutants de protéase du VIH (256).

Enfin, les mesures des CI50 dans un modèle bactérien d'*E. coli* transformé avec les enzymes *PfDHFR* et *PfDHPS* ont permis de mettre en évidence, *in vitro*, la synergie d'action entre la pyriméthamine et la sulfadoxine (245).

Ces différents outils biologiques présentent certaines limites pour l'évaluation des phénotypes de résistance. Les résultats obtenus doivent être corroborés à ceux des études observationnelles et ceux obtenus grâce aux modèles murins.

Les méthodes *in silico* ouvre de nouvelles perspectives de compréhension du mode d'action des molécules thérapeutiques et des différents mécanismes de résistance mis en jeu par les microorganismes.

#### IV. Etude structurale *in-silico*

Les études structurales sont un outil précieux pour comprendre les mécanismes de résistance. Une mutation ponctuelle peut en effet affecter le repliement, la dynamique, mais aussi la structure, la stabilité, l'affinité aux ligands et donc la réactivité d'un site actif.

##### 1. Principe de la modélisation

La structure tertiaire est un élément essentiel de la fonction d'une protéine et de ses interactions. Dans le cas d'une enzyme, la structure tertiaire définit son site actif qui lui permettra de catalyser une réaction chimique. Cette structure tertiaire peut être déterminée par différentes techniques expérimentales, telles que la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la cryo-microscopie électronique. La première résolution d'une protéine par diffraction des rayons X a été obtenue pour la myoglobine, en 1958, par J. Kendrew *et al.* (257). Cette approche reste à ce jour la principale technique de résolution (258). Elle peut nécessiter plusieurs années et impose de disposer d'une quantité importante de protéine pure et d'obtenir des cristaux stables et de taille suffisante, ce qui n'est pas toujours réalisable. Dans les années 2020, sur les 200 millions de protéines découvertes sous toutes les formes de vie, seules 170 000 structures avaient été résolues (259). Ces dernières années sont marquées par l'avènement de l'intelligence artificielle et de l'algorithme AlphaFold (260), comme en témoigne le prix de Nobel de Chimie 2024 décerné à David Baker, Demis Hassabis et John M. Jumper pour leurs travaux sur l'intelligence artificielle en biologie structurale (261). Ainsi, la structure tridimensionnelle probable d'une protéine peut rapidement être obtenue. Cependant, cette prédiction de structure, même avec un degré de confiance sans précédent, ne remplace pas les approches expérimentales. La résolution de la structure tertiaire permet d'obtenir une image statique qui apporte des éléments essentiels mais non suffisants. En effet, les molécules sont en réalité très dynamiques, en perpétuel mouvement. Leurs mouvements sont généralement critiques pour leur fonction et leur interaction avec d'autres partenaires. Les protéines, par exemple, subissent de nombreux changements de conformation (262). De plus, certaines portions de molécules trop flexibles ne peuvent être résolues par la diffraction des rayons X. La RMN peut être une alternative, mais sur des structures de tailles limitées.

Diverses techniques expérimentales peuvent fournir des informations sur la dynamique des protéines, mais elles sont généralement limitées dans leur résolution spatiale et temporelle. La dynamique moléculaire, méthode basée sur la résolution des équations de mouvement de Newton et l'utilisation de champs de force décrivant les interactions atomiques, permet de

simuler l'évolution temporelle (dynamique) d'un système moléculaire et ainsi, de décrire les mouvements des biomolécules en conditions physiologiques avec une précision atomique. Les simulations de dynamique moléculaire sont des outils, largement utilisées, pour étudier le repliement des protéines, les liaisons des ligands, la liaison médicamenteuse, le transport membranaire ou encore les changements conformationnels critiques pour la fonction des protéines, parfois difficile voire impossible à observer expérimentalement. La dynamique moléculaire s'appuie sur le calcul de l'énergie potentielle associée à une conformation donnée, puis sur l'exploration du paysage énergétique pour déterminer la configuration la plus stable, c'est-à-dire de plus basse énergie (263).

Les simulations de dynamique moléculaire permettant de prendre en compte le rôle de l'environnement (solvant, pH, température). La majorité des systèmes moléculaires évoluent dans un solvant, généralement l'eau, à température ambiante. Ainsi, lors d'une simulation, le système est solvato et une température de 300 K est généralement appliquée. La complexité du système ainsi que le temps de calcul qui en découle sont proportionnels au nombre d'atomes du système. Les simulations de dynamique moléculaire sont donc exigeantes en ressources de calcul. D'une part, le calcul de la force à chaque pas de temps nécessite un calcul substantiel. D'autre part, il doit être répété plusieurs fois. Le pas de temps doit être déterminé afin d'obtenir le meilleur compromis entre le temps de calcul nécessaire et l'obtention de résultats réalistes. Plus le pas de temps est petit, plus les résultats sont précis mais plus le temps de calcul nécessaire est important. Les pas individuels sont limités à quelques femtosecondes par des vibrations atomiques rapides, de sorte que simuler une milliseconde de temps physique nécessite près d'un trillion de pas (262).

### 1.1. Mécanique moléculaire classique

La mécanique moléculaire classique (MM) permet de simuler des molécules de type protéines ou ADN/ARN. Chaque atome du système est représenté par une particule sphérique. Les positions et les vitesses des particules sphériques évoluent selon les lois de la physique classique. Les forces agissant sur ces particules sont calculées à l'aide d'un ensemble de fonctions mathématiques permettant de calculer l'énergie d'une molécule, connu sous le nom de champ de force. L'énergie du système (figure 18) est donnée par la somme des interactions covalentes (les énergies d'élongation de liaison, de déformation angulaire et de rotation (torsions propres et impropres)) et les interactions non covalentes (somme des interactions de van der Waals et électrostatiques).

$$\begin{aligned}
U_{total} = & \sum_{liaisons} K_r (r - r_0)^2 \\
& + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{torsions} K_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta)) + \sum_{impropres} K_{imp} (\phi - \phi_0)^2 \\
& + \sum_{\substack{paires \\ non\ liées\ i,j}} \left( \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \right)
\end{aligned}$$

Figure 18 : Equation de l'énergie du système par mécanique moléculaire classique

$K_r$ ,  $K_\theta$ ,  $K_\chi$  et  $K_{imp}$  sont les constantes de forces des différents potentiels ;  $r$ ,  $\theta$ ,  $\chi$  et  $\phi$  la longueur, l'angle, l'angle dièdre et l'angle dièdre impropre de la liaison considérée ;  $r_0$ ,  $\theta_0$ , et  $\phi_0$  leurs valeurs à l'équilibre ;  $n$  correspond à la périodicité de la torsion et  $\delta$  l'angle de phase ;  $\epsilon_{ij}$  à la profondeur du puits du potentiel de Lennard-Jones,  $\epsilon_0$  à la permittivité du milieu,  $r_{ij}$  est la distance séparant les deux atomes en interaction  $q_i$ , et  $q_j$  leurs charges respectives ;  $R_{min_{ij}}$  correspond à la valeur de  $r_{ij}$  pour laquelle le potentiel s'annule.

La complexité de ces calculs est liée au nombre et à la variété des liaisons à traiter. En effet, les protéines comportent plusieurs milliers d'atomes.

Les améliorations récentes de la vitesse de simulation réalisable et des modèles de champ de force ont permis des simulations au niveau atomique sur des échelles de temps de l'ordre de la milliseconde (262). En 2009, la première simulation d'une protéine par dynamique moléculaire sur une durée d'une milliseconde a été publiée (264).

## 1.2. Mécanique quantique / mécanique moléculaire

Ces modèles multi-échelles pour les systèmes chimiques complexes ont été développés à partir de 1976, par Martin Karplus, Michel Levitt et Arieh Warshel qui furent récompensés en 2013 par le prix Nobel de Chimie (265). Cette méthode est aujourd'hui largement employée et donne des résultats de simulations moléculaires précis.

Les simulations quantiques étant très coûteuses en temps de calcul, elles sont incompatibles avec des systèmes de plusieurs milliers d'atomes. Les approches hybrides mécanique quantique / mécanique moléculaire (QM/MM) permettent de combiner différents niveaux de description. L'ensemble du système est divisé en deux régions. Une région quantique (région QM) est traitée

par mécanique quantique, alors que le reste du système (région MM) est étudié par mécanique moléculaire classique, décrite par des champs de force (figure 19).

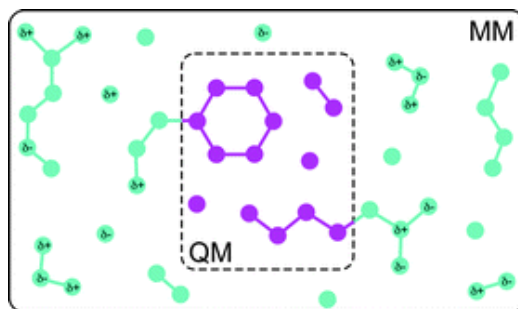


Figure 19 : Représentation schématique de l'approche hybride mécanique quantique / mécanique moléculaire (QM/MM)

Le système est divisé en deux régions, région quantique (QM) et une région traitée par mécanique moléculaire classique (MM). Les pointillés autour de la région QM représente la région limite

L'approche hybride QM/MM permet de faire cohabiter une méthode de dynamique moléculaire classique, dont l'avantage réside dans la possibilité de modéliser des molécules de taille importante, et une méthode de simulation quantique, qui permet, entre autres, de simuler des réactions chimiques et d'autres processus électroniques, tels que le transfert de charge. Ainsi, l'approche QM/MM est un outil précieux pour la modélisation des biomolécules, des systèmes inorganiques et organométalliques (266). Pour les réactions enzymatiques, la région QM correspond généralement au site actif. Notons qu'elle doit être choisie et paramétrée avec précaution.

Différentes méthodes de calcul de mécanique quantique peuvent être utilisées pour calculer l'énergie associée à cette région QM. Nous pouvons en particulier citer la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), qui modélise la structure électronique d'un système en utilisant la densité électronique, ou encore les méthodes semi-empiriques (par exemple PM3 ou PM6) qui simplifient les calculs en utilisant des paramètres ajustés sur des données expérimentales et en négligeant certaines intégrales. La DFT est une approche *ab initio* (sans paramètres empiriques) et généralement plus précise, mais aussi plus coûteuse en ressources.

L'énergie QM/MM de l'ensemble du système est finalement obtenue en considérant la région MM et la région QM. La principale difficulté repose sur l'interface entre ces deux régions. Des précautions doivent être prises à la frontière entre les deux régions, appelée région limite. Différentes approches existent, nous ne décrivons ici que celle utilisée dans le cadre de cette

thèse. Par défaut, le logiciel AMBER (que nous aborderons dans le paragraphe suivant) utilise un schéma d'intégration électrostatique. Dans ce cadre, l'interaction des charges ponctuelles de la région MM avec les électrons du système QM, ainsi que l'interaction entre les charges ponctuelles MM et les noyaux atomiques QM, sont prises en compte explicitement. En d'autres termes, la région MM polarise la densité électronique de la région QM.

La région QM doit être néanmoins paramétrée avec précaution. Les principales difficultés reposent sur les liaisons entre régions QM et MM, ainsi que sur le choix de la région QM. Des précautions doivent être prises à la frontière entre les deux régions, appelée région limite.

### 1.3. Package AMBER

Il existe de nombreux logiciels permettant de réaliser des simulations de dynamique moléculaire. Un des plus utilisés est le package de programmes informatiques AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) qui a été développé à partir de la fin des années 1970. Il contient désormais de nombreux outils pour la dynamique moléculaire et les calculs d'énergie libre des protéines. Les champs de force liés à AMBER sont parmi les plus utilisés pour la dynamique moléculaire (267). Parmi les champs de force, on peut citer ff14SB, utilisé pour les systèmes protéiques (268). Pour ce travail, le package AMBER a été utilisé.

## 2. Les structures de la PfdHFR

Comme vu précédemment, la DHFR catalyse la réduction du DHF en THF, en utilisant le NADPH comme cofacteur (figure 20).

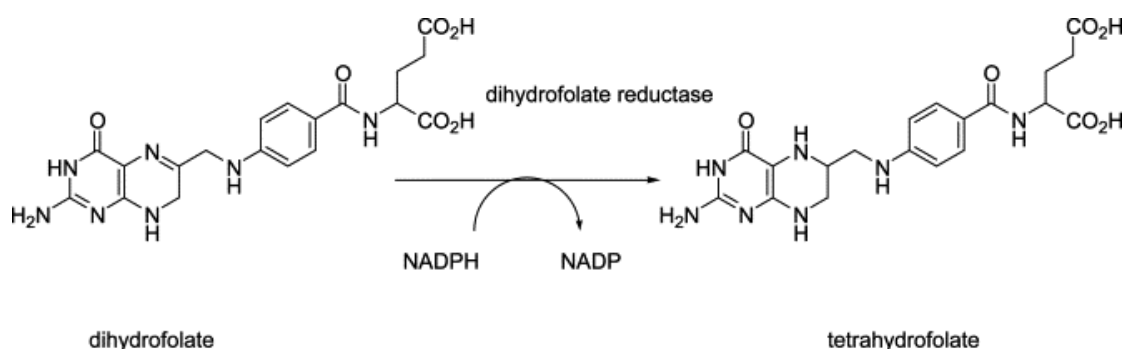


Figure 20 : Réaction catalysée par la dihydrofolate réductase

La DHFR catalyse la réduction du 7,8-dihydrofolate (DHF) en 5,6,7,8-tétrahydrofolate (THF) en utilisant la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme cofacteur

(Gilbert, 2002)

La *PfDHFR* présente des similitudes de séquence avec les enzymes DHFR appartenant à d'autres espèces, mais avec suffisamment de différences pour une inhibition préférentielle et ainsi, en faire une cible appropriée. Différents modèles de l'enzyme *PfDHFR*, obtenus par homologie, ont été proposés dès la fin des années 1990 (269–272). Puis, les premières structures cristallines de la *PfDHFR*, dont l'enzyme sous sa forme sauvage (PDB : 1J3I), ont été résolues par diffraction des rayons X et publiées en 2003 (244).

Le polypeptide *PfDHFR*-TS contient 608 acides aminés. Les 231 premiers résidus constituent le domaine de la DHFR, les 89 résidus suivants forment la région de jonction et les 288 derniers résidus représentent le domaine de la TS (244). La *PfDHFR* est composée de 2 inserts. Le premier et le deuxième inserts correspondent aux résidus 20 à 36 et 64 à 99, respectivement (244). Il a été montré que la région de jonction entre les domaines DHFR et TS présente dans les enzymes plasmodiales, est impliquée dans d'importants contacts inter-domaines.

Dans les enzymes DHFR-TS bifonctionnelles, il est possible que le DHF, produit par la TS, soit rapidement canalisé vers le site actif de la DHFR. Ce phénomène, appelé « canalisation du substrat », donne lieu à une catalyse globale plus efficace que celle de deux enzymes monofonctionnelles distinctes (244).

La région du site actif de la *PfDHFR* comprend les résidus Ile14, Ala16, Trp48, Asp54, Phe58, Ser108, Ile164 et Thr185 (244). Ces résidus interagissent également avec les inhibiteurs de la *PfDHFR*. La pyriméthamine se lie au niveau du site actif par des liaisons hydrogènes et des interactions de type van der Waals. Les résidus impliqués dans le phénomène de résistance, Ala16, Cys50, Asn51, Cys59, Ser108 et Ile164 (tableau 1), sont situés dans la région du site actif. Les résidus 51 et 59 sont situés sur la même hélice que le résidu Asp54 qui est un élément crucial pour la liaison des substrats et des inhibiteurs.

Yuvaniyama *et al.* ont montré que la mutation Asn51Ile provoque un mouvement important des résidus de 48 à 51 (244). La mutation Ile164Leu provoque, quant à elle, un déplacement des résidus 164 à 167. Les mouvements des résidus 48 à 51 et 164 à 167 ouvriraient l'écart de site actif entre les résidus 50 et 164 et réduiraient l'affinité de liaison de petits inhibiteurs comme la pyriméthamine. Les travaux de Delfino *et al.* ont montré que la mutation *PfDHFR* Ser108Asn entraînerait une difficulté d'hébergement de la pyriméthamine dans le site actif due à un affrontement entre le groupe NH<sub>2</sub> de l'asparagine et le chlore de la pyriméthamine, déplaçant alors la pyriméthamine de sa position (272). Ce déplacement provoque alors l'affrontement du groupement éthyle de la pyriméthamine à l'un des atomes d'oxygène du carboxylate de l'acide

aspartique 54 (Asp54). L'effet de cette mutation avec le cycloguanil est moins marqué, en raison de la présence de deux groupes méthyle, au lieu d'un éthyle. Les différentes contraintes stériques sont exacerbées lorsque les mutations de la *PfDHFR* s'accumulent.

L'étude des différentes structures de *PfDHFR*, sous sa forme sauvage et mutée, a permis la conception, la caractérisation et le développement préclinique d'un candidat-médicament, le P218, qui inhibe à la fois la *PfDHFR* sauvage et les formes mutées connues (273).

### 3. Les structures de la *PfDHPS*

La DHPS est une enzyme appartenant à la famille des enzymes triose-phosphate isomérase (tonneau TIM) (274), avec 8 feuillets bêta flanqués de 8 hélices alpha périphériques (figure 21).

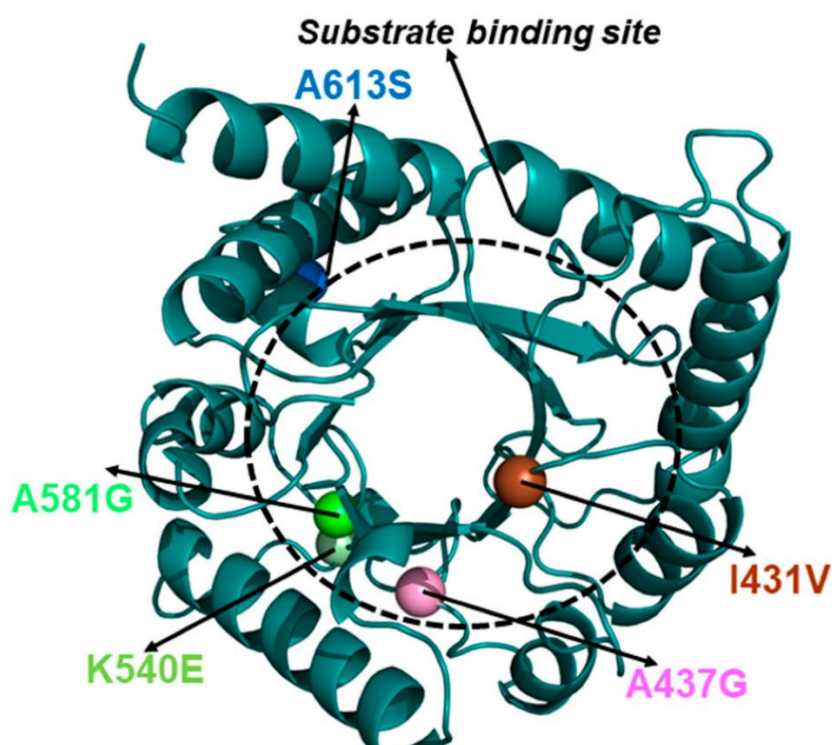


Figure 21 : Structure globale de la dihydroptéroate synthase de *Plasmodium falciparum*  
(Boateng, 2022)

Les structures cristallines des DHPS de nombreux organismes ont été déterminées. Les premières structures de la DHPS d'*E. coli* (275) et de *Staphylococcus aureus* (276) ont été résolues dès 1997. Puis, la structure cristalline de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de *P. vivax* a été résolue en 2018, par Yogavel *et al.* (277). Plus récemment, en 2020, les premières structures cristallines de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de *P. falciparum* ont été

publiées par Chitnumsub *et al.* mais comportent quelques parties manquantes (254). L'absence d'une structure cristalline de cette enzyme HPPK-DHPS de *P. falciparum* pendant toutes ces années a limité la faisabilité des études computationnelles et n'a pas permis d'élucider, le mécanisme détaillé de la résistance à la sulfadoxine et des autres sulfamides chez *P. falciparum*, causée par les différentes substitutions d'acides aminés.

Il existe un degré élevé de conservation dans les séquences des domaines DHPS plasmodiaux, (274). L'homologie des acides aminés de l'enzyme HPPK-DHPS de *P. falciparum* est de 58%, 59% et 60% avec les enzymes HPPK-DHPS de *P. berghei*, *P. vivax* et *P. chabaudi*, respectivement (278). Cependant, la longueur des différents inserts est spécifique à chaque espèce. Les DHPS des différentes espèces plasmodiales possèdent 2 inserts. Le premier insert est conservé entre *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. chabaudi*, mais pas entre *P. vivax* et *P. falciparum*, ni en longueur ni en séquence. Le deuxième insert est également hautement conservé entre ces cinq espèces plasmodiales, notamment à l'extrémité C-terminale. Cependant, les enzymes DHPS de *P. vivax* et *P. falciparum* possèdent 58 et 5 résidus supplémentaires, respectivement (274). Les inserts spécifiques au parasite seraient importants pour le fonctionnement des enzymes bifonctionnelles (279).

Pour pallier au manque de données structurales, plusieurs propositions de modèle par homologie de la PfDHPS ont été publiées en 2004, 2006, puis en 2016 (194, 274, 278). Le premier modèle de la PfDHPS, proposé par Korsinczky *et al.*, a été réalisé à partir des structures cristallines de *E. coli* (1AJ0), de *Thermoplasma acidophilum* (1PMA) et de *Mycobacterium tuberculosis* (1EYE) (278). Dans ce modèle, les 2 inserts de la PfDHPS ont été exclus. Le deuxième modèle, proposé par Beer *et al.* (274), fut construit à partir des structures cristallines de *M. tuberculosis* (1EYE) et *Bacillus anthracis* (1TX0). L'homologie de séquence entre la DHPS de *P. falciparum* et de *M. tuberculosis* était de 31%. Dans ce deuxième modèle, l'insert 1 de la PfDHPS a été conservé. Enfin, la structure proposée par Oguike *et al.* a été réalisée à partir de 6 structures cristallines de *S. aureus* (1AD1), *E. coli* (1AJ0), *Coxiella burnetti* (3TR9), *M. tuberculosis* (1EYE), *Saccharomyces cerevisiae* (2BMB) et *B. anthracis* (1TX2) (194). Dans ce modèle, 89% des résidus ont été modélisés avec un fort indice de confiance, supérieure à 90%. L'indice de confiance pour les résidus 624 à 666, correspondant au deuxième insert de la DHPS de *P. falciparum*, était faible, avec une valeur de QMEAN de 0,567 (fiabilité estimée entre 0 et 1).

Les structures cristallines de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de *P. falciparum* publiées en 2020, par Chitnumsub *et al.* révèlent que la distance entre les sites actifs de HPPK et DHPS est d'environ 40 Å (figure 22) (254).

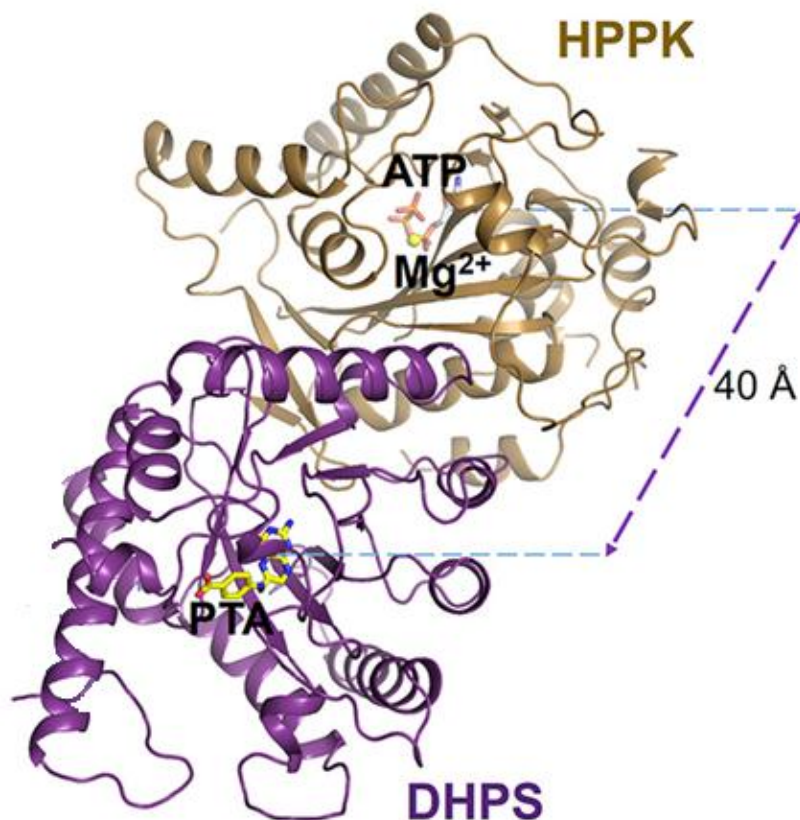


Figure 22 : Structure de l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de *Plasmodium falciparum*

PTA : acide ptéroïque

(adaptée de Chitnumsub, 2020)

L'analyse de la surface de potentiel électrostatique a révélé une région chargée positivement depuis l'insert 1, à l'arrière du site actif de la HPPK, vers la poche DHPS, en passant par la boucle D5. Cela indique la présence d'un possible chemin de guidage le long de la surface de l'enzyme pour le DHPPP qui contient un groupe pyrophosphate chargé négativement (254). Cette propriété de l'enzyme bifonctionnelle facilite la réaction suivante (280). Le premier insert de la *PfDHPS*, appelé insert N3, est composé d'une dizaine de résidus et pourrait interagir avec le domaine *PfHPPK*, stabilisant ainsi les interactions domaine-domaine à l'intérieur du protomère.

Le site catalytique de la *PfDHPS* est composé de l'extrémité C-terminale des feuillet bêta centraux et des boucles D1, D2, D5, D6 et D7 (figure 23).

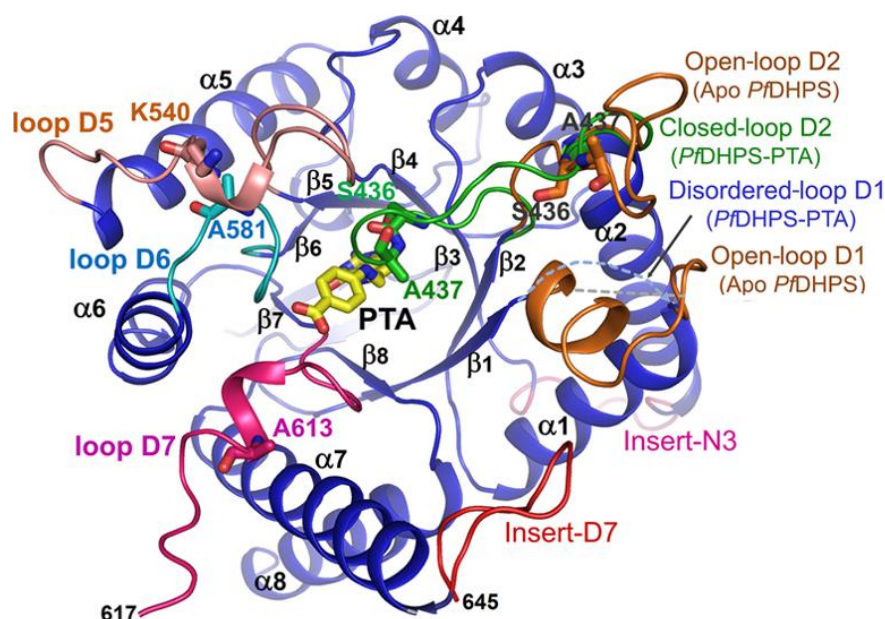


Figure 23 : Conformation des boucles de la dihydroptéroate synthase de *P. falciparum*

PTA : acide ptéroïque

(Chitnumsub, 2020)

Les boucles D1 et D2 sont flexibles, et les différentes conformations observées (ouvertes, fermées et désordonnées) dépendent du substrat (figure 23). Lorsque la PfDHPS est complexée au ligand naturel, la boucle D1 est désordonnée alors que la boucle D2 adopte une conformation fermée, protégeant ainsi le site actif (figure 24).

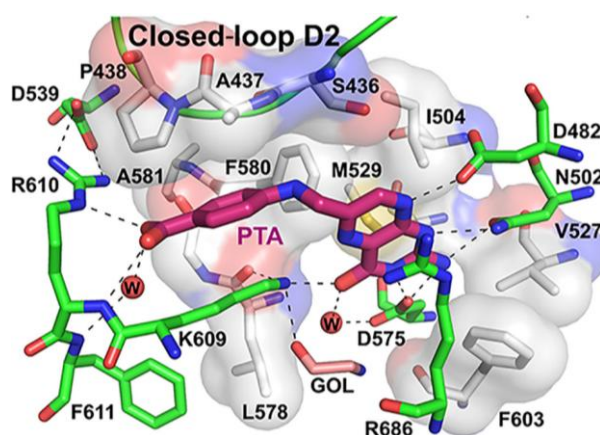


Figure 24 : Interaction de l'acide ptéroïque avec la PfDHPS de type sauvage

La boucle D2 adopte une conformation fermée, protégeant le site actif

PTA : acide ptéroïque

(Chitnumsub, 2020)

Les résidus de la *Pf*DHPS connus pour être mutés sont situés dans quatre boucles flexibles et conservées à l'exception du résidu Ile431 situé dans le brin  $\beta$ 2. Les résidus Ser436 et Ala437 sont situés dans la boucle D2, Lys540 dans la boucle D5, Ala581 dans la boucle D6 et Ala613 dans la boucle D7. A ce jour, aucune mutation de la boucle D1 n'est décrite.

### 3.1. Interactions avec les ligands naturels de la *Pf*DHPS

Les poches de liaison du *p*ABA et du DHPPP sont presque perpendiculaires l'une à l'autre. Dans les travaux de Chitnumsub *et al.*, (254) la poche de liaison du *p*ABA de la *Pf*DHPS sauvage comprenait des résidus de la boucle D2 (Ser436, Ala437, Pro438), D5 (Asp539), D6 (Phe580) et D7 (Lys 609 et Arg 610).

Dans les systèmes étudiés par Chitnumsub *et al.*, (254) la boucle D1 est uniquement impliquée dans la liaison du substrat DHPPP, de manière similaire à ce qui est retrouvé pour la *Pv*DHPS (277). Les résidus du site actif en contact avec le DHPPP semblent être hautement conservés entre les enzymes des différents organismes (274). Le cycle ptérine du DHPPP interagit avec l'Asp482, l'Asn502, l'Ile504, la Val527, la M529, l'Asp575, la Lys609 et l'Arg686.

La mutation Ala581Gly provoque une réduction importante de l'affinité de la *Pf*DHPS pour le *p*ABA. Cette mutation entraîne un déplacement des résidus Phe580 et Arg610, perturbant alors l'interaction, ce qui provoquerait une diminution de l'efficacité enzymatique (254).

La présence des ligands naturels fournit probablement un site d'accostage pour la boucle D2, qui subit un réarrangement conformationnel majeur et adopte une conformation fermée. Cela permet la création d'une poche catalytique complète qui améliore l'interaction globale avec le *p*ABA (254). Différentes observations ont conclu que l'un des rôles de la boucle 2 est de stabiliser la liaison du *p*ABA au site actif (281). La flexibilité de la boucle D2 est accrue dans les formes mutantes. La mutation Ala437Gly stabilise la fermeture de la boucle D2, favorisant ainsi la catalyse, expliquant l'augmentation de l'efficacité catalytique observée (254).

L'activité de la *Pf*DHPS dépend de la présence de l'ion magnésium. Cet ion magnésium est coordonné de manière octaédrique avec les deux atomes d'oxygène distaux du pyrophosphate, l'oxygène d'un résidu Asn de la DHPS et trois molécules d'eau (281). Cet ion magnésium ancre le groupe pyrophosphate du DHPPP, garantissant ainsi le maintien de l'orientation correcte du substrat dans le site actif, et semble être important pour stabiliser le groupement pyrophosphate lors de la réaction (282).

### 3.2. Interactions avec la sulfadoxine, inhibiteur de la PfdHPS

La sulfadoxine, inhibiteur compétitif de la DHPS, semble interagir principalement avec la PfdHPS par le biais d'interactions hydrophobes. Dans le premier modèle de PfdHPS obtenu par homologie (278), la sulfadoxine a été amarrée au site actif prédit, guidée par l'orientation de la sulfanilamide en complexe avec la DHPS d'*E. coli* (1AJ0). Dix résidus de contact ont été prédits pour interagir directement avec la sulfadoxine (figure 25).

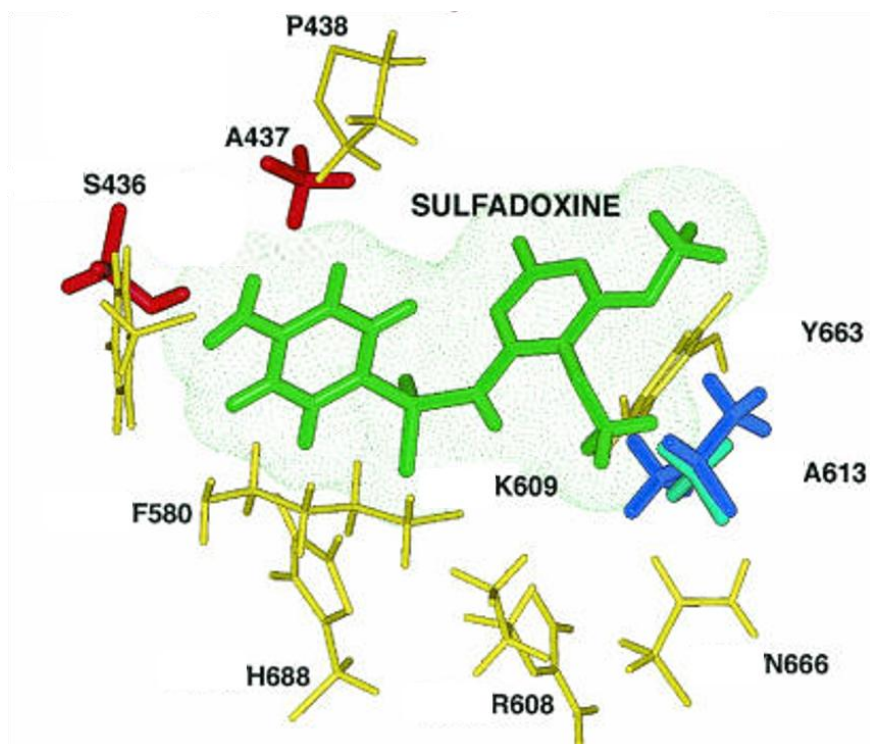


Figure 25 : Résidus de la PfdHPS pouvant être en contact avec la sulfadoxine

(adaptée de Korsinczky, 2004)

Les résidus Ser436, Ala437 et Ala613 de la PfdHPS, connus pour être mutés et associés à la résistance à la sulfadoxine, étaient, dans ce modèle, impliqués dans les interactions avec la sulfadoxine. La mutation Ser436Phe de la PfdHPS constituerait une altération majeure dû à un encombrement stérique important empêchant la liaison de la sulfadoxine. La mutation Ser436Ala aurait un effet beaucoup moins grave en raison d'un encombrement stérique minime. La mutation Ala437Gly entraînerait, quant à elle, une perte d'interaction hydrophobe entre la chaîne latérale de l'alanine et le cycle de la sulfadoxine, réduisant significativement l'affinité de liaison. La Lys540 est un résidu de surface situé à environ 10 Å du site de liaison de la sulfadoxine. La mutation Lys540Glu provoque une inversion de charge (positive vers négative),

ce qui entraîne une réorientation de l'Arg610 et, par conséquent, des résidus Pro438 et Lys609, provoquant une modification modérée du site de liaison. Puis, le résidu Ala581 situé à environ 9 Å du site de liaison de la sulfadoxine entraîne, lorsqu'il est muté (Ala581Gly) une perturbation du résidu de contact Phe580, et dans une moindre mesure, du site de liaison. Enfin, la mutation Ala613Ser entraînerait une réduction des contacts hydrophobes avec la sulfadoxine.

Puis, de Beer *et al.* ont confirmé l'importance des interactions hydrophobes entre différents résidus et la sulfadoxine (274). Ils ont montré que les groupements méthoxy de la sulfadoxine interagissaient avec la chaîne latérale de la Lys540. La mutation Lys540Glu provoquait un raccourcissement de la chaîne latérale hydrophobe, une augmentation de l'hydrophilie du résidu 540 et donc, une perte de cette interaction. Puis, le résidu Ala581 qui fait partie d'une poche hydrophobe où s'associent les groupements méthoxy de la sulfadoxine, une fois muté (Ala581Gly), entraînait une perte d'interaction hydrophobe avec la sulfadoxine. Dans ce modèle, à la différence du modèle proposé par Korsinczky *et al.* (278), les résidus Ala613 et Arg608 n'interagissaient pas avec la sulfadoxine. L'orientation de la sulfadoxine dans ces 2 modèles était légèrement différente, probablement lié au fait que le deuxième modèle incluait le substrat DHPPP.

Boateng *et al.* montrent une perte d'interactions entre la sulfadoxine et les formes mutées de la PfDHPS par rapport à la forme sauvage de l'enzyme (283). Une interaction cation- $\pi$  entre la sulfadoxine et le résidu Met538 est présente dans le système sauvage alors qu'elle n'est pas retrouvée dans les formes mutées. Puis, une interaction défavorable avec le résidu His584 est retrouvée dans les systèmes vSAKAA, ISgKAA, ISAEAA, ISAKgs et ISgKgs.

Les travaux de dynamique moléculaire de Boateng *et al.* ont montré que la sulfadoxine était libérée du site actif dans les systèmes ISAKgA et ISAKAs alors que, dans le système ISgKgs, elle s'était déplacée de sa région de liaison d'origine vers un site proche où elle est restée de manière stable pendant le temps de simulation restant (283).

### 3.3. Mécanisme réactionnel de la DHPS

Les enzymes, de par leur fonction de catalyseur biologique, jouent un rôle central dans le monde du vivant. La compréhension du mécanisme réactionnel est un objectif majeur.

Le rôle de la DHPS dans la voie de biosynthèse des folates est maintenant assez bien connu (284). Comme vu précédemment, la DHPS catalyse la formation d'une liaison entre l'atome

d'azote du *p*ABA et le C9 du DHPPP, pour former le DHP et la libération d'un pyrophosphate (figure 26).

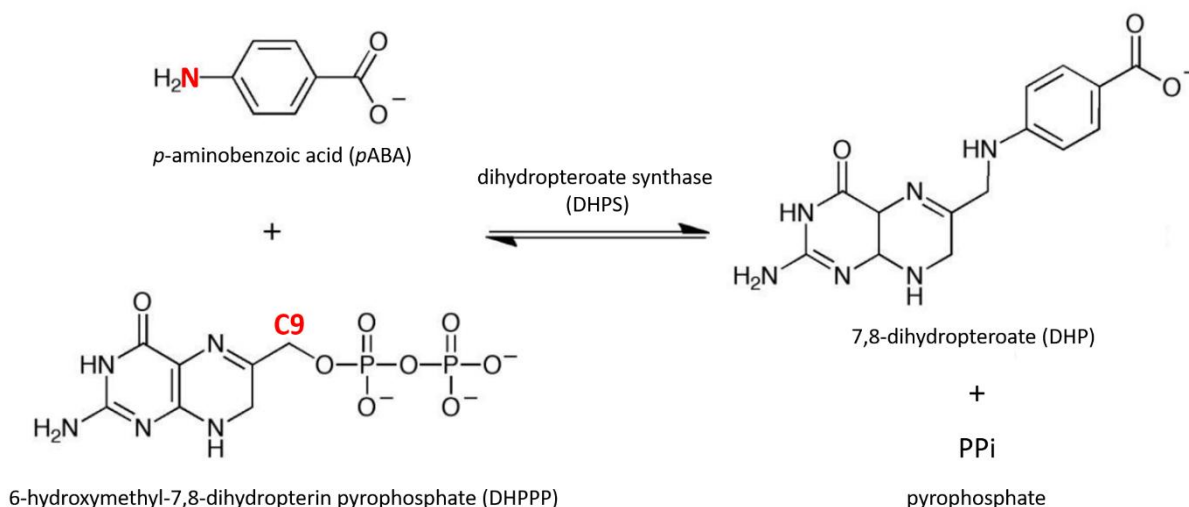


Figure 26 : Réaction catalysée par la dihydroptéroate synthase

La DHPS facilite la formation d'une liaison covalente entre le C9 du 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine (DHPPP) et l'atome d'azote de l'acide *p*-aminobenzoïque (*p*ABA), pour former le 7,8-dihydroptéroate (DHP) et la libération d'un pyrophosphate.

De nombreuses structures cristallines détaillées de la DHPS pour différents micro-organismes sont disponibles. Cependant, le mécanisme réactionnel reste, aujourd'hui, peu étudié. Plusieurs études s'y sont intéressées, mais l'ordre de la substitution nucléophile n'est, à ce jour, pas encore clairement défini.

Une substitution nucléophile d'ordre 2 (S<sub>N</sub>2) se réalise en un seul acte élémentaire (figure 27). L'approche du nucléophile et le départ du nucléofuge se déroulent au cours de la même étape. Sur la représentation du diagramme énergétique, un seul état de transition est visible. A l'inverse, une substitution nucléophile d'ordre 1 (S<sub>N</sub>1) se déroule en deux actes élémentaires, avec un intermédiaire réactionnel. Sur la représentation du diagramme énergétique, deux états de transition sont alors visibles (285).

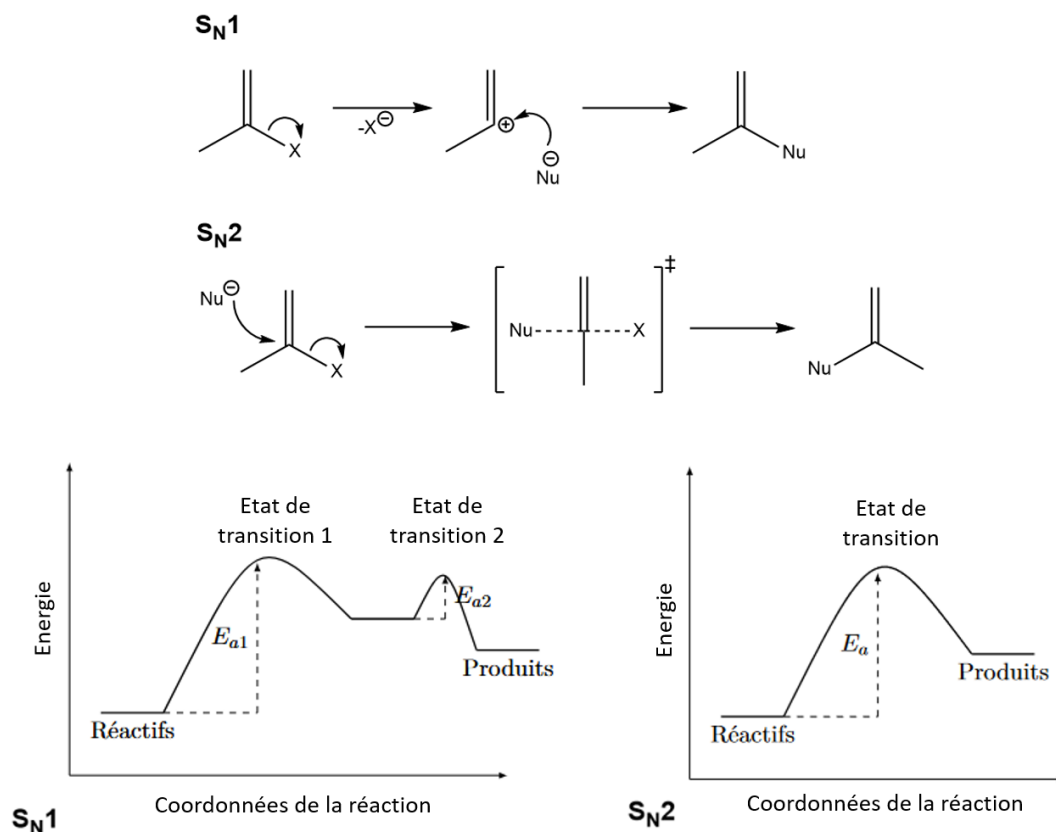


Figure 27 : Substitutions nucléophile d'ordre 1 (S<sub>N</sub>1) et d'ordre 2 (S<sub>N</sub>2)

Une S<sub>N</sub>1 se déroule en deux actes élémentaires avec la présence d'un intermédiaire réactionnel, une S<sub>N</sub>2 se réalise en un seul acte élémentaire.

Nu : nucléophile

(Adaptée de Roizard)

Baca *et al.*, ont suggéré un mécanisme réactionnel de type S<sub>N</sub>2 pour la DHPS (286). L'attaque nucléophile du groupement amine (NH<sub>2</sub>) du *p*ABA (formation de la liaison C9 – N) et la sortie du pyrophosphate (rupture de la liaison C9 – O) se produiraient de manière concertée (figure 28), bien que le groupement amine du *p*ABA soit faiblement nucléophile. Cette hypothèse a été corroborée par les observations de Babaoglu *et al.* (287).

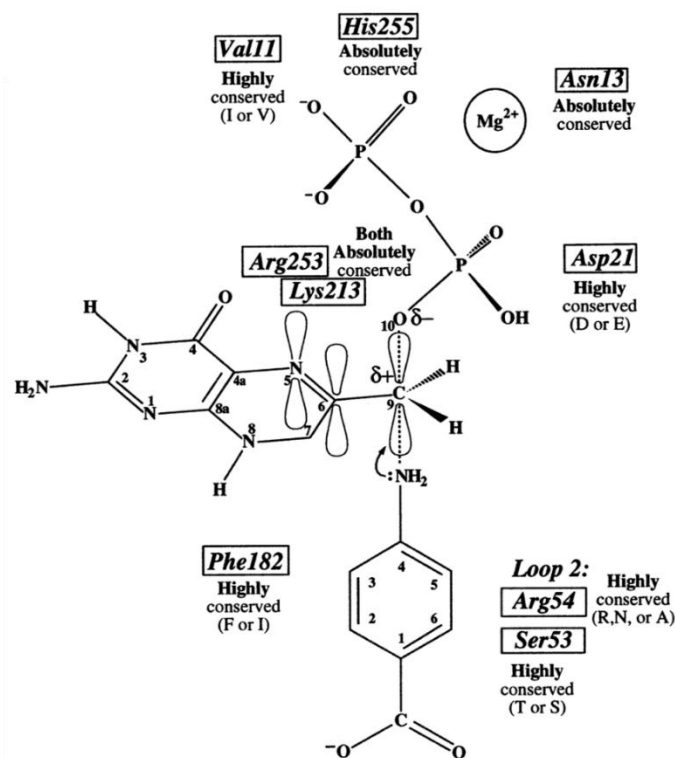


Figure 28 : Proposition de la géométrie de l'état de transition de la réaction catalysée par la DHPS

Etude réalisée à l'aide de la DHPS de *Mycobacterium tuberculosis*. Le groupement  $\text{NH}_2$  du *pABA* attaquerait le C9 du DHPPP à partir d'une position opposée au pyrophosphate.

(Baca, 2000)

Puis, des données de cristallographie en utilisant les enzymes DHPS de *Bacillus anthracis* et *Yersinia pestis* ont mis en évidence des structures intermédiaires, où la liaison ptérine – pyrophosphate (C9 – O) était rompue, alors que l'attaque nucléophile par le *pABA* n'avait pas encore eu lieu, et que la liaison C9 – N n'était pas encore formée (figure 29). De plus, en l'absence de *pABA* ou en présence de son analogue, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, du pyrophosphate était tout de même libéré. Ainsi, Yun *et al.* ont proposé un mécanisme réactionnel de type  $\text{S}_{\text{N}}1$ , avec la formation d'un intermédiaire réactionnel cationique de type ptérine (281). Dans un premier temps, le pyrophosphate (PPi) du DHPPP serait éliminé. Il en résulterait une espèce intermédiaire cationique ( $\text{DHP}^+$ ) dans laquelle la charge positive serait délocalisée au niveau de la ptérine et stabilisée par la poche de liaison à la ptérine. Les résidus Asp101 et Asp184 auraient pour rôle de stabiliser ces formes de résonance. Puis, dans un deuxième temps, le groupe amine du *pABA* attaquerait  $\text{DHP}^+$  au niveau de l'atome de carbone C9 pour générer le DHP. D'après les données expérimentales, l'étape déterminante de la vitesse réactionnelle était la rupture de la liaison C9 – O du DHPPP. Ces observations ont été

complétées par des calculs QM avec la méthode de la DFT et ont mis en évidence que l'intermédiaire réactionnel ( $\text{DHP}^+$ ) était stable (281). Cependant, dans ce modèle, les calculs QM n'incluaient pas le substrat *p*ABA.

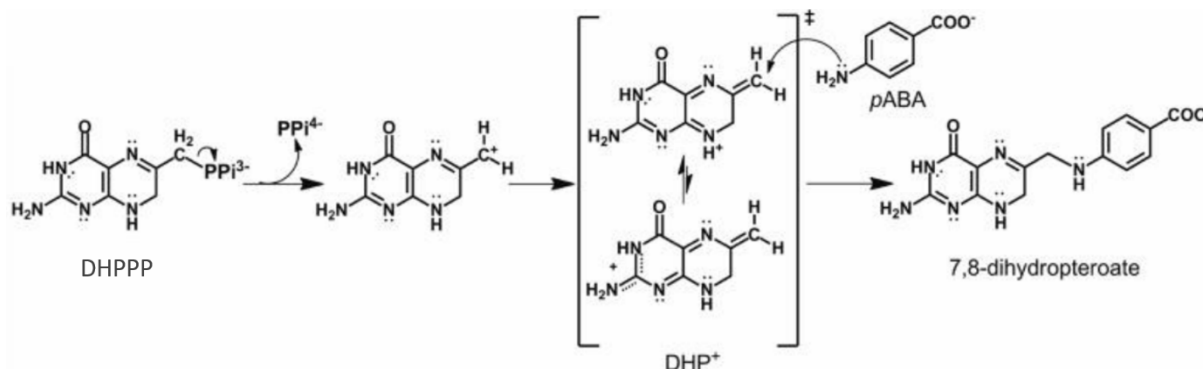


Figure 29 : Substitution nucléophile d'ordre 1 ( $\text{S}_{\text{N}}1$ ) de la DHPS proposée par Yun *et al.*

La condensation du *p*ABA et du DHPPP se réaliserait en deux étapes successives : la rupture de la liaison C9-O du DHPPP avec libération du pyrophosphate, puis attaque nucléophile du *p*ABA et formation du 7,8-dihydroptéroate

(Yun, 2012)

Puis, Chotpatiwechkul *et al.* ont étudié le mécanisme réactionnel à l'aide de la méthode hybride QM/MM, en utilisant la DHPS de *Y. pestis* (PDB : 3TYZ). Dans ces travaux, les tentatives pour un mécanisme réactionnel  $\text{S}_{\text{N}}2$  ont échoué, en raison, d'une part, du  $\text{pK}_a$  élevé de la fonction amine du *p*ABA et, d'autre part, de la distance trop grande au groupement pyrophosphate. Un mécanisme réactionnel de type  $\text{S}_{\text{N}}1$ , avec la présence d'un intermédiaire réactionnel, a alors été privilégié (288). Deux états de transition ont été proposés : le premier intermédiaire réactionnel sous forme de carbocation et le second de nature neutre en raison du transfert concomitant d'un proton de N8 de DHPPP à l'Asp101 de la DHPS de *Y. pestis* (figure 30). Les deux intermédiaires réactionnels prédits étaient stables et l'Asp101, comme montré par Yun *et al.* (281), jouait un rôle clé dans la stabilisation de l'intermédiaire réactionnel (288).

Pour la deuxième étape du mécanisme réactionnel, un transfert de proton est nécessaire. Pour ce faire, une base doit être suffisamment proche du *p*ABA. L'analyse des données structurales a suggéré que le pyrophosphate était la seule base présente à proximité. Ainsi, lorsque la Lys220 est sous forme protonnée, le transfert de proton vers le bêta-phosphate du pyrophosphate semble être la seule possibilité. L'énergie nécessaire pour cette deuxième étape est inférieure à la première, ce qui corrobore avec le fait qu'il ne s'agisse pas de l'étape déterminante. Les deux états de transition proposés convergent vers le même produit réactionnel, la formation du DHP.

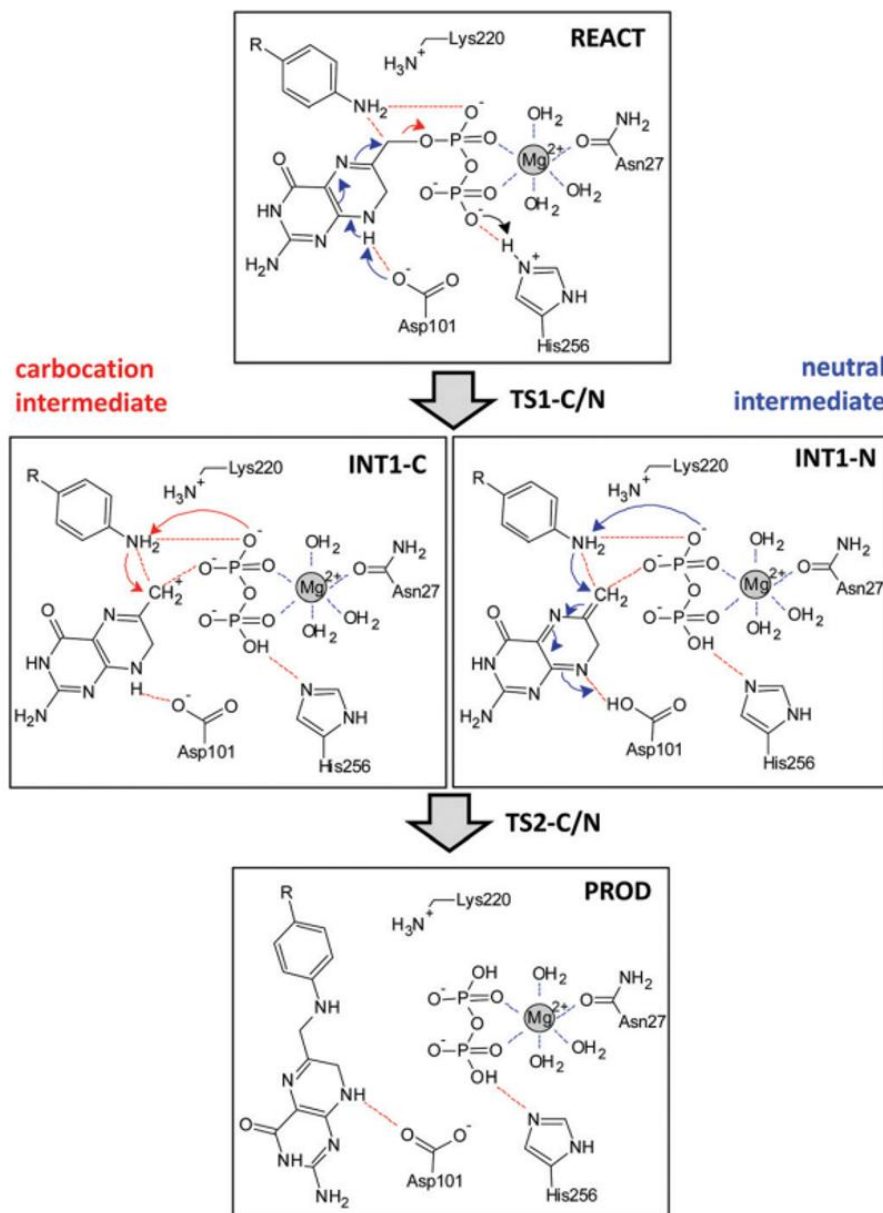


Figure 30 : Mécanisme réactionnel de la DHPS

Deux intermédiaires réactionnels sont proposés dans cette substitution nucléophile d'ordre 1 ( $S_N1$ ), l'un cationique, l'autre neutre.

(Chotpatiwetchkul, 2012)

Puis, l'état de protonation de la Lys220 a également été étudié. En effet, le pKa de ce résidu a été prédit à 4,6. Ainsi, avec un pH de 7, la Lys220 de la DHPS serait préférentiellement sous forme neutre, et pourrait servir de base pour la deuxième étape de la réaction (288).

Lorsque la Lys220 était sous forme protonée, l'intermédiaire réactionnel neutre était énergétiquement plus favorable que l'intermédiaire carbocationique. A l'inverse, lorsque la

Lys220 était sous forme déprotonée, l'intermédiaire carbocationique était plus favorable, ce qui est en accord avec les données de cristallographie aux rayons X (281).

Enfin, des observations expérimentales ont montré que les sulfamides, inhibiteurs compétitifs de la DHPS, pouvaient se condenser avec le DHPPP et être convertis en sulfa-DHP (figure 31) (281). Une analyse de la réactivité du sulfathiazole (STZ) a alors pu être réalisée. La partie aniline du STZ interagissait plus fortement avec le pyrophosphate du DHPPP que le *p*ABA. La condensation du STZ avec le DHPPP présentait avec une barrière énergétique faible, quel que soit l'état de protonation de la Lys220. Lorsque la Lys220 était protonée, l'intermédiaire réactionnel neutre était privilégié. A l'inverse, lorsque la Lys220 était sous forme déprotonée, l'intermédiaire réactionnel sous forme de carbocation se révélait être celui présentant la barrière énergétique la plus faible (288).

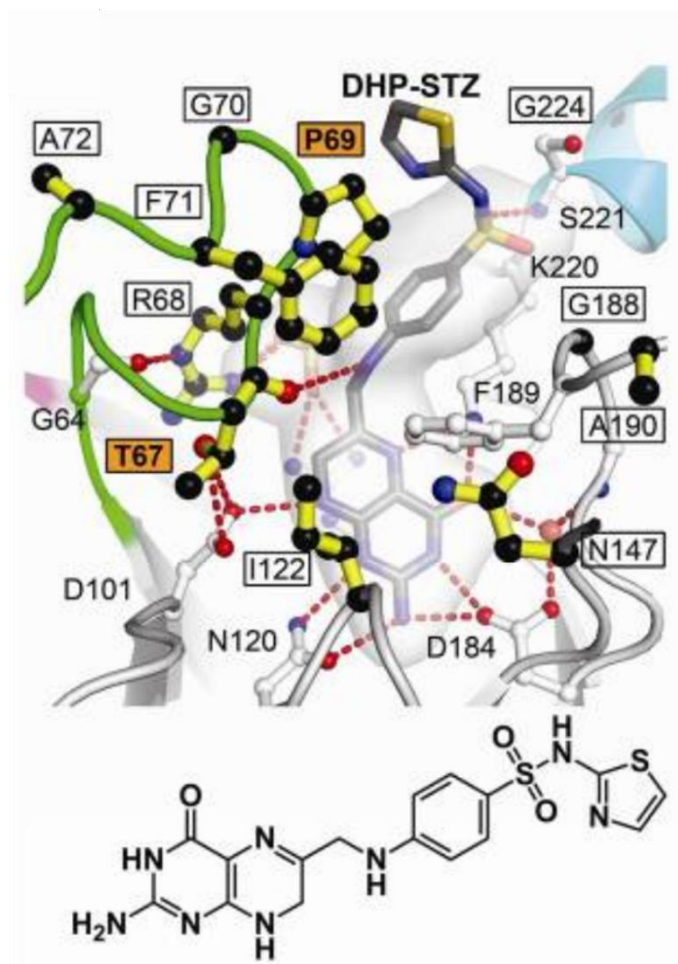


Figure 31 : Formation de sulfathiazole–DHP lié au site actif de la DHPS de *Bacillus anthracis*  
Produit issu de la mise en contact de DHPPP et de sulfathiazole avec la DHPS de *Bacillus anthracis*.

(Yun, 2012)

## **Partie II : Travaux de recherche**

## I. Problématique et objectifs

Depuis sa première description en 2009, à partir d'échantillons prélevés en 2006-2007 au Nigéria (192), la mutation Ile431Val semble être émergente. Cependant, la mutation Ile431Val n'était que rarement recherchée dans les différents travaux épidémiologiques, les études récentes ne s'intéressant souvent qu'aux mutations *PfDHPS* Ala437Gly, Lys540Glu et Ala581Gly. Par exemple, la base de données WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) SP Molecular Surveyor (289), de l'infectious diseases data observatory ne répertorie pas, à ce jour, la mutation Ile431Val et il existe peu de données épidémiologiques et historiques sur cette mutation. L'allèle *PfDHPS* le plus fréquemment associé à cette mutation est le quintuple mutant **vagKgs**. Etant décrit que l'accumulation de mutations de la *PfDHPS* augmente le niveau de résistance à la sulfadoxine (98), cet allèle est fortement suspecté d'un haut niveau de résistance.

Ainsi, le **premier objectif** de ce travail a été de déterminer la diversité et les fréquences des allèles de la *PfDHPS* porteurs de la mutation Ile431Val en fonction des zones géographiques, et d'évaluer leurs dynamiques d'émergence et de propagation.

Notre **deuxième objectif** a été d'évaluer l'impact de cette mutation et des allèles associés sur l'efficacité de la SP utilisée dans le traitement préventif du paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans.

Contrairement aux autres antipaludiques, il n'existe pas de tests phénotypiques *in vitro* de référence qui soient fiables pour évaluer l'efficacité de la sulfadoxine, expliquant ainsi l'absence de données de sensibilité associées à la mutation Ile431Val et à ses allèles. Pour pallier ce manque, plusieurs stratégies ont été envisagées, telles que le développement de modèles *in vivo*, *in vitro* et *in silico*. L'intégration de la *PfDHPS*, par modification génétique de parasites murins ou de bactéries, a permis le développement d'outils pour l'évaluation phénotypique. Le **troisième objectif** de ce travail était de décrire, par l'utilisation d'un modèle *in silico*, la structure de la *PfDHPS* sous ses formes sauvage et mutées, et de comprendre l'impact des différentes mutations, à l'échelle atomique, sur l'activité de l'enzyme. La relation structure-activité de l'enzyme a été évaluée par l'étude des interactions avec son ligand naturel et son inhibiteur, la sulfadoxine.

Enfin, ces différentes structures stables et fiables de la *PfDHPS* étaient un prérequis à l'étude du mécanisme réactionnel de l'enzyme, qui constituait le **dernier objectif** de cette thèse.

## II. Etude de l'évolution et de la propagation des mutations de DHPS de *Plasmodium falciparum* en Afrique Centrale

### 1. Introduction

La résistance à la sulfadoxine chez *P. falciparum* est conférée par des mutations de l'enzyme *PfDHPS*. La mutation Ile431Val de *PfDHPS* est la mutation la plus récemment décrite, retrouvée en 2006-2007 au Nigéria (192), puis au Cameroun en 2010 (193). Bien que cette mutation soit décrite depuis plus de 15 ans, elle n'est que peu ou pas recherchée dans les travaux épidémiologiques, à la différence des autres mutations de la *PfDHPS* (Ser436Ala, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly et Ala613Ser). Plusieurs raisons expliquent cet état de fait. Tout d'abord, outre le séquençage, l'utilisation de méthodes telles que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) représente une limite technologique. Des travaux récents, utilisant cette technologie, n'ont pas pu déterminer la fréquence de cette mutation (290, 291). Par ailleurs, la mutation Ile431Val étant située en amont des mutations classiquement recherchées, les amorces habituellement utilisées pour le séquençage ne sont pas optimales et la lecture du chromatogramme peut être difficile à cette position. De plus, l'absence de données phénotypiques ne favorise pas la recherche systématique de cette mutation. Ainsi, la fréquence de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS* à l'échelle du continent africain n'est pas connue.

Cette étude épidémiologique a été réalisée en collaboration avec 18 centres de santé répartis sur 7 pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest (Angola, Cameroun, République centrafricaine, Gabon, Nigéria, République démocratique du Congo et République du Congo). Les échantillons ont été collectés entre 2014 et 2018, auprès de patients atteints de paludisme à *P. falciparum*. Les données de séquençage issues de ces échantillons ont été complétées avec celles disponibles sur le réseau de partage de données MalariaGEN, contenant 7 000 génomes de *P. falciparum* provenant de 28 pays où le paludisme est endémique (292).

Puis, l'étude de l'origine évolutive et la dynamique d'émergence des mutations de la *PfDHPS* a été réalisée à l'aide de l'étude du polymorphisme de 3 microsatellites (164), marqueurs de génétique des populations, dans la région flanquant le gène *pf dhps*. En effet, les marqueurs microsatellites présentent un pouvoir discriminant important et sont utilisés dans de nombreuses applications telles que la génétique des populations ou la biologie de la conservation. Les microsatellites sont des régions d'ADN non codantes, contenant de courtes séquences de quelques nucléotides (généralement 1 à 6 bases), répétées en tandem. Ils sont neutres sur le plan de la sélection, hautement polymorphes et hérités avec les gènes voisins. Le nombre de

répétitions des motifs nucléotidiques est variable (293). Ainsi, l'ascendance de diverses mutations de résistance peut être déterminée en examinant le polymorphisme des microsatellites flanquant les gènes de résistance. Une réduction de la diversité de ces microsatellites autour du gène de résistance indique une forte sélection des isolats résistants en présence du traitement cible. De plus, en comparant les haplotypes des microsatellites, constitués de la combinaison de plusieurs allèles de microsatellites situés à proximité du gène de résistance, il est possible de retracer l'histoire évolutive de la résistance et la propagation spatiale des parasites résistants. Ces microsatellites sont nombreux dans le génome de *P. falciparum* et représentent 12% de son génome (294). Par comparaison, ils représentent 1,6% du génome humain (295).

Une amplification sélective du génome de *P. falciparum* (296) a permis la réalisation du séquençage du génome entier de certains échantillons représentatifs. En comparant ces génomes à d'autres issus de la banque de données MalariaGEN (292), des précisions sur l'histoire de l'émergence de ces allèles ont pu être apportées.

## **2. Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study**

*Emilie Guémas<sup>#</sup>, Romain Coppée<sup>#</sup>, Sandie Ménard<sup>#</sup>, Milena du Manoir, Sandrine Nsango, Dieudonné Makaba Mvumbi, Emmanuel Nakoune, Carole Eboumbou, Marielle Karine Bouyou Akotet, Tatfeng Youtchou Mirabeau, Sylvie Manguin, Doudou Malekita Yobi, Jean Akiana, Lady Charlène Kouna, Denise Patricia Mawili Mboumba, Dominique Fatima Voumbo-Matoumona, Alliance-Laure Otam, Pierre-Alain Rubbo, Jean-Pierre Lombart, Elisabeth Kwanai, Olivia Cohen, Xavier Iriart, Lawrence Ayong, Jean Bernard Lekana-Douki, Frédéric Arieu, Antoine Berry\**

Lancet Microbe. 2023 Dec; 4(12):e983–93. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00211-2

# Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study



Emilie Guémas\*, Romain Coppée\*, Sandie Ménard\*, Milena du Manoir, Sandrine Nsango, Dieudonné Makaba Mvumbi, Emmanuel Nakoune, Carole Else Eboumbou Moukoko, Marielle Karine Bouyou Akotet, Tatfeng Youtchou Mirabeau, Sylvie Manguin, Doudou Malekita Yobi, Jean Akiana, Lady Charlene Kouna, Denise Patricia Mawili Mboumba, Dominique Fatima Voumbo-Matoumona, Alliance-Laure Otam, Pierre-Alain Rubbo, Jean-Pierre Lombart, Elisabeth Kwanai, Olivia Cohen, Xavier Iriart, Lawrence Ayong, Jean Bernard Lekana-Douki, Frédéric Arieu, Antoine Berry

## Summary

**Background** Efficacy of sulfadoxine–pyrimethamine, the malaria chemoprophylaxis used in pregnant women, and in children when combined with amodiaquine, is threatened by the accumulation of mutations in the *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (*pfdhps*) and dihydrofolate reductase (*pfdhfr*) genes. Data on the prevalence of resistant alleles in central Africa and the new *pfdhps* I431V mutation, particularly associated with other mutations to form the *pfdhps* vagKgs allele, are scarce. We explored the frequency and geographical distribution of *pfdhps* and *pfdhfr* mutations in central Africa in 2014–18, and assessed the evolutionary origin of the vagKgs allele.

**Methods** Samples were collected at 18 health-care centres in seven countries (Angola, Cameroon, Central African Republic, Democratic Republic of the Congo, Gabon, Nigeria, and Republic of the Congo) from patients who showed possible symptoms of malaria between March 1, 2014, and Oct 31, 2018. Samples that were positive for *P falciparum* were transported to a laboratory in Toulouse, France, and genotyped. The frequency of *pfdhfr* and *pfdhps* mutations was studied in 1749 samples. Microsatellites in *pfdhps* flanking regions and whole-genome analysis compared with parasite genomes from the data-sharing network MalariaGEN were performed on samples carrying the vagKgs allele.

**Findings** Mapping of the prevalence of single nucleotide polymorphisms and corresponding alleles of *pfdhfr* and *pfdhps* showed a substantial spread of alleles associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in central Africa during the 2014–18 period, especially an increase going west to east in *pfdhps* alleles carrying the K540E and A581G mutations. A high prevalence of the *pfdhps* I431V mutation was observed in Cameroon (exceeding 50% in the northern region) and Nigeria. Genomic analysis showed a recent African emergence and a clonal expansion of the most frequent *pfdhps* vagKgs allele.

**Interpretation** Reduced sulfadoxine–pyrimethamine efficacy due to increased resistance is a worrying situation, especially because the malaria transmission level is high in central Africa. Although the resistance phenotype remains to be confirmed, the emergence and spread of the vagKgs allele in west and central Africa could challenge the use of sulfadoxine–pyrimethamine.

**Funding** Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases.

**Copyright** © 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an Open Access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license.

## Introduction

Pregnancy-associated malaria is a major cause of maternal anaemia, prematurity, and low birthweight, which can lead to maternal or neonatal death.<sup>1</sup> The antimalarial sulfadoxine–pyrimethamine combination is used throughout Africa for intermittent preventive treatment in pregnancy and is associated with substantial reductions in malaria burden. Moreover, seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine–pyrimethamine plus amodiaquine has been implemented in 13 countries in the Sahel subregion, representing 45 million children younger than 5 years who were

treated in 2021.<sup>2</sup> This policy has rapidly led to a reduction in malaria hospitalisations and deaths.<sup>3</sup>

However, *Plasmodium falciparum* has developed resistance to sulfadoxine–pyrimethamine due to point mutations in the dihydropteroate synthase (*pfdhps*) and dihydrofolate reductase (*pfdhfr*) genes encoding enzymes involved in the obligate folate biosynthesis pathway and targeted by sulfadoxine and pyrimethamine, respectively.<sup>4</sup> The *pfdhfr* C50, N51I, C59R, S108N, I164 triple mutant (CirnI allele) confers a high level of resistance to pyrimethamine and spread in Africa in the 1980s from a single ancestor originating in southeast Asia.<sup>5</sup> Similarly

*Lancet Microbe* 2023; 4: e983–93

Published Online  
October 18, 2023  
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00211-2)

\*Contributed equally

Institut Toulouse des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, CNRS UMR5051, INSERM UMR 1291, UPS, Toulouse, France (E Guémas PharmD, S Ménard PhD, M du Manoir PhD, A-L Otam MSc, O Cohen MD, X Iriart PhD, Prof A Berry PhD); Département de Parasitologie et Mycologie, CHU Toulouse, Toulouse, France (E Guémas, X Iriart, A Berry); LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France (E Guémas); Université Paris Cité and Sorbonne Paris Nord, INSERM, IAME, Paris, France (R Coppée PhD); Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala, Douala, Cameroun (S Nsango PhD, Prof C E Eboumbou Moukoko PhD); Malaria Research Unit, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroun (S Nsango, Prof C E Eboumbou Moukoko, L Ayong PhD); Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo (D Makaba Mvumbi PhD, D Malekita Yobi PhD); Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium (D Makaba Mvumbi); Institut Pasteur de Bangui, Bangui, Central African Republic (E Nakoune PhD, P-A Rubbo PhD, J-P Lombart PharmD); Département de Parasitologie Mycologie Médecine Tropicale, Faculté de Médecine de l'Université des Sciences de la

Santé, Libreville, Gabon  
 (Prof M K Bouyou Akotet PhD,  
 D P Mawili Mboumba PhD);  
 Centre de Recherche  
 Biomédicale en Pathogènes  
 Infectieux et Pathologies  
 Associées, CREIPA, Université  
 des Sciences de la Santé,  
 Libreville, Gabon  
 (M K Bouyou Akotet,  
 D P Mawili Mboumba);  
 Department of Medical  
 Laboratory Science, Faculty of  
 Basic Medical Sciences, College  
 of Health Sciences, Niger Delta  
 University, Wilberforce Island,  
 Nigeria (Prof T Y Mirabeau PhD);  
 Hydro Sciences Montpellier,  
 Université de Montpellier,  
 CNRS, IRD, Montpellier, France  
 (Prof S Manguin PhD);  
 Laboratoire National de Santé  
 Publique, Université Marien  
 Nguabi, Brazzaville, Republic  
 of the Congo (J Akiana PhD,  
 D F Voumbo-Matoumona PhD);  
 Unité d'Évolution  
 Épidémiologie et Résistances  
 Parasitaires, Centre  
 Interdisciplinaire de Recherches  
 Médicales de Franceville,  
 Franceville, Gabon  
 (L C Kouina PhD,  
 D F Voumbo-Matoumona,  
 Prof J B Lekana-Douki PhD);  
 Département de Parasitologie-  
 Mycologie, Université des  
 Sciences de la Santé, Libreville,  
 Gabon (L C Kouina,  
 D F Voumbo-Matoumona,  
 Prof J B Lekana-Douki);  
 Coordination diocésaine de la  
 Santé, Diocèse de Maroua-  
 Mokolo, Maroua, Cameroon  
 (E Kwanai BSc); INSERM U1016,  
 Institut Cochin, Laboratoire de  
 Parasitologie-Mycologie,  
 Hôpital Cochin, AP-HP,  
 Université Paris Cité, Paris,  
 France (Prof F Ariey PhD)

Correspondence to:  
 Prof Antoine Berry, Institut  
 Toulousain des Maladies  
 Infectieuses et Inflammatoires  
 (Infinity), Université de Toulouse,  
 CNRS UMR5051, INSERM  
 UMR 1291, UPS, Toulouse 31300,  
 France  
 berry.a@chu-toulouse.fr

## Research in context

### Evidence before this study

The antimalarial sulfadoxine-pyrimethamine combination is used throughout Africa for intermittent preventive treatment in pregnancy and is associated with substantial reductions in malaria burden. In combination with amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine is also used for seasonal malaria chemoprevention in children younger than 5 years. However, over time, *Plasmodium falciparum* has developed resistance to sulfadoxine-pyrimethamine due to point mutations in the dihydropteroate synthase (*pf dhps*) and dihydrofolate reductase (*pf dhfr*) genes. The accumulation of mutations in these genes is positively correlated with the level of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine. So far, two *pf dhps* resistance genotypes are of concern due to their actual or potential impact on the efficacy of malarial prophylaxis. First, the *pf dhps* allele harbouring both A437G and K540E mutations, either combined or not with A581G, diminishes the efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine prophylaxis. These genotypes, which are prevalent in eastern and southern Africa, could potentially spread by contiguity to central Africa. We searched PubMed on June 15, 2023, for articles published since Jan 1, 2010, using the search terms “((malaria) AND (pf dhps OR dhps)) AND (K540E or 540E or A581G or 581G) AND (Cameroon OR Congo OR Democratic Republic of the Congo OR Gabon OR Central African Republic OR Angola)”. Of the 28 publications found, 18 corresponded to prevalence surveys from identified sites but not from samples collected after therapeutic pressure by sulfadoxine-pyrimethamine (six in the Democratic Republic of the Congo, six in Cameroon, five in Angola, one in Gabon). None of these articles were able to provide an exhaustive view of the prevalence of *pf dhps* resistance alleles in this very vast region. Second, a novel *pf dhps* I431V mutation was described in 2009 in some regions of central and western Africa. This mutation was mostly associated with four other substitutions (S436A, A437G, A581G, and A613S), forming the *pf dhps* vagKgs quintuple mutant. We searched PubMed on June 15, 2023, for articles published since database inception, using the search terms “((malaria) AND (pf dhps or dhps)) AND (I431V or 431V)”. 17 studies reported the *pf dhps* I431V mutation but none of them provided information about its origin and reason for emergence or its impact on clinical resistance to sulfadoxine-pyrimethamine. The lack of data prompted us to conduct this study.

### Added value of this study

We mapped the prevalence of single nucleotide polymorphisms and corresponding alleles of the *pf dhfr* and *pf dhps* genes from 1749 samples collected in a wide-ranging area of sub-Saharan Africa (18 sites across six countries in central Africa and in one neighbouring country, Nigeria) over the 2014–18 period. The prevalence of the *pf dhps* K540E mutation, with or without the additional *pf dhps* A581G mutation, has considerably increased since previous surveys with an east to west gradient. We also describe the distribution of the I431V mutation, which is highly prevalent in Nigeria and Cameroon, particularly in northern Cameroon (>50%). By compiling data from this study with information from the data-sharing network MalariaGEN and many other studies, a total of 12 270 *pf dhps* sequences from 36 countries were obtained, providing a comprehensive assessment of the prevalence and evolutionary origin of the *pf dhps* I431V mutation. The *pf dhps* I431V mutation has spread across 15 countries in west and central Africa but is not found in east Africa and other malaria-endemic continents. We show the unique emergence of this mutation in west or central Africa and the non-association of the vagKgs allele with specific mutations or gene amplification elsewhere in the genome. None of the samples contained both *pf dhps* I431V and K540E mutations. The opposite mapping of K540E and I431V mutations could suggest that I431V plays a similar role in west and central Africa to K540E in east Africa—namely, a marker of high resistance to sulfadoxine-pyrimethamine.

### Implications of all the available evidence

The increased prevalence of alleles carrying the K540E mutation, A581G mutation, or both reduces the efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine-based prophylaxis in central Africa, one of the most malaria-affected areas in Africa. Furthermore, the recent and widespread emergence of the I431V mutation and its predominant vagKgs allele is a worrisome reality. Indeed, the absence of vagKgs-associated molecular events, as reported in our study, suggests that the selection of parasites carrying the vagKgs allele is probably only due to its phenotypic advantage. Therefore, there is an urgent need for clinical data to confirm that the vagKgs allele confers an increased level of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine. The resistant phenotype of the vagKgs allele, if confirmed, would require reconsideration of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis.

in *pf dhps*, the A437G mutation alone or in combination with K540E is responsible for sulfadoxine-pyrimethamine treatment failures.<sup>4</sup> Geographical distribution is heterogeneous across Africa with, historically, a west and central Africa pattern for the single A437G mutation but an eastern and southern Africa pattern for the A437G and K540E combination.<sup>4</sup> These different alleles emerged independently in the 1990s and, unlike the *pf dhfr* alleles, originated from Africa.<sup>6</sup>

The *pf dhps* I431V mutation was first described at low frequency in Nigeria in 2007,<sup>7</sup> then in Cameroon in 2010,<sup>8</sup> and later in several central and west African countries.<sup>9</sup> This mutation was mostly found in a *pf dhfr/pf dhps* CirnI/vagKgs octuple mutant (N51I, C59R, and S108N in *pf dhfr* and I431V, S436A, A437G, A581G, and A613S in *pf dhps*). To date, little is known about this I431V mutation and its associated alleles, both in terms of geographical distribution and

prevalence as well as its effect on clinical sulfadoxine–pyrimethamine resistance.

In our study, we explored the frequency and geographical distribution of *pfdhps* and *pfdhfr* mutations in central Africa during 2014–18. We also assessed the evolutionary origin of selected parasites harbouring the *vagKgs* allele using whole-genome sequencing.

## Methods

### Study design and sample collection

This study was carried out between March 1, 2014, and Oct 31, 2018, at 18 sites in six central African countries (Angola, Cameroon, Central African Republic, Democratic Republic of the Congo, Gabon, and Republic of the Congo) and one neighbouring country (Nigeria; appendix p 20). The study was approved by the ethics committee in each country and by the French National INSERM Ethics Committee.

Patients consulting in the health-care centres taking part in the study who had symptoms suggestive of malaria were tested for malaria (thick smear or immunochromatographic rapid diagnostic test). Patients with a confirmed *P falciparum*-positive test were enrolled as volunteers after giving their informed consent. Patients with severe malaria according to WHO criteria<sup>9</sup> were excluded from the study. No parasite density criteria were requested because only successfully genotyped samples were analysed. A drop of previously collected blood was placed on filter paper (Whatman FTA Elute Card; Whatman, Middlesex, UK), stored dry, and transferred to the Infinity laboratory in Toulouse (France). DNA was extracted according to the manufacturer's instructions and stored at –20°C until use.

### Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping

PCR amplification and Sanger sequencing of *pfdhfr* and *pfdhps* genes were performed as previously described.<sup>8</sup> For samples with mixed infections, we analysed SNPs and alleles only if one allele was present with a 2:1 ratio (ie, the signal of the minority sequence was less than half the intensity of the majority one) and considered as the majority allele. The mutated codons are written in lower case. 95% CIs of proportions were calculated using the Wilson score method without continuity correction.

### PCR microsatellite analysis

The evolutionary origins of *pfdhps* alleles were investigated by analysing the polymorphism of three microsatellites in the flanking region located at 0·8 kb, 4·3 kb, and 7·7 kb from the 3' end of *pfdhps*. We selected samples containing the alleles of interest and a representative sampling of the other alleles. Semi-nested PCRs were performed independently for each microsatellite, as previously described.<sup>11</sup> PCR fragment size was determined by electrophoresis on an ABI 3730 XL DNA Analyser (Applied Biosystems, Waltham, MA,

USA) and analysed with Peak Scanner version 1.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In mixed samples, the data were considered missing at this locus for this sample.

Genetic diversity using microsatellites was analysed by calculating the expected heterozygosity (*H<sub>e</sub>*) with FSTAT version 2.9.4.<sup>12</sup> Microsatellite haplotypes of the two most closely linked markers were ranked, first to allele size at locus 0·8 kb and then by allele size at locus 4·3 kb. A high diversity of microsatellite haplotypes suggested an absence of allele selection, whereas a loss in microsatellite haplotype diversity was evidence of positive selection.<sup>6</sup>

### Whole-genome sequencing

The selective whole-genome amplification approach was used to enrich *P falciparum* DNA from total DNA extracts before whole-genome sequencing, as previously described.<sup>13</sup> Amplified products were cleaned using Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

After mechanically shearing 250 ng of total DNA with the Covaris S220 Focused Ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA), genomic DNA libraries were constructed for high-throughput sequencing using the KAPA HyperPrep Library Preparation Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) then checked for quantity and quality using Qubit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for concentration and BioAnalyser 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) for fragment size. Libraries were sequenced as paired-end 150-bp reads using an Illumina NextSeq 500 (San Diego, CA, USA) instrument at the GENOM'IC facility at the Cochin Institute (Paris, France).

### Whole-genome analyses

Raw sequence data were first subjected to standard Illumina quality control procedures. Raw reads were then mapped to the *P falciparum* 3D7 reference genome v39 using the Burrows-Wheeler Aligner software version 0.7.15.<sup>14</sup> An analysis pipeline for variant discovery and genotyping, including stringent quality control filters that took into account the unusual features of the *P falciparum* genome, was developed similarly to that proposed by the MalariaGEN consortium (appendix p 2).<sup>15</sup>

The genetic variation of our samples containing the alleles of interest was compared to that of previously sequenced *P falciparum* isolates.<sup>15</sup> A discriminant analysis of principal components was performed on samples originating from Africa, South America, and southeast Asia using the adegenet package in R.<sup>16</sup> For principal component analysis, we subsequently focused on African countries harbouring at least one *vagKgs*-carrying isolate in the MalariaGEN database. The analysis was restricted on SNPs genotyped in a range of 50 kb upstream or downstream of *pfdhps* using BEDtools v.2.26.0.<sup>17</sup> An SNP

See Online for appendix

Number of <i>pf</i> drps sequences	Prevalence of <i>pf</i> drps allele, % (95% CI), n										
	ISAKAA	laAKAA	ISgKAA	lagKAA	lagKAs	ISgeAA	ISgeGA	ISAgAA	vagKAA	vagKAs	Other alleles*
<b>Angola</b>											
Balombo (2017)	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	56.9% (44.1-68.8); 33	19.0% (10.9-30.9); 11	0.0% (0.0-6.2); 0	24.1% (15.0-36.5); 14	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0
<b>Cameroon</b>											
Douala (2014)	1.2% (0.2-6.3); 1	10.5% (5.6-18.7); 9	65.1% (54.6-74.3); 56	5.8% (2.5-12.9); 5	0.0% (0.0-4.3); 0	0.0% (0.0-4.3); 0	0.0% (0.0-4.3); 0	0.0% (0.0-4.3); 0	2.3% (0.6-8.1); 2	0.0% (0.0-4.3); 0	7.0% (3.2-14.4); 6
Garoua (2014)	10.6% (6.0-18.0); 11	33.7% (25.3-43.2); 35	26.9% (19.3-36.2); 28	5.8% (2.7-12.0); 6	3.8% (1.5-9.5); 4	1.0% (0.0-5.2); 1	0.0% (0.0-3.6); 0	0.0% (0.0-3.6); 0	1.9% (0.5-6.7); 2	1.9% (0.5-6.7); 2	9.6% (5.3-16.8); 10
Maroua (2017)	5.0% (2.4-10.0); 7	15.0% (10.0-21.8); 21	20.7% (14.8-28.2); 29	0.7% (0.1-3.9); 1	2.9% (1.1-7.1); 4	0.0% (0.0-2.7); 0	0.0% (0.0-2.7); 0	0.0% (0.0-2.7); 0	5.0% (2.4-10.0); 7	0.7% (0.1-3.9); 1	48.6% (40.4-56.8); 68
Tibati (2015)	2.0% (0.6-7.1); 2	33.3% (24.8-43.1); 33	39.4% (30.3-49.2); 39	12.1% (7.1-20.0); 12	0.0% (0.0-3.7); 0	0.0% (0.0-3.7); 0	0.0% (0.0-3.7); 0	0.0% (0.0-3.7); 0	6.1% (2.8-12.6); 6	1.0% (0.2-5.5); 1	4.0% (1.6-9.9); 4
Yaoundé (2015)	2.6% (0.7-9.0); 2	14.3% (8.2-23.8); 11	55.8% (44.7-66.4); 43	13.0% (7.2-22.3); 10	2.6% (0.7-9.0); 2	0.0% (0.0-4.8); 0	0.0% (0.0-4.8); 0	0.0% (0.0-4.8); 0	5.2% (2.0-12.6); 4	0.0% (0.0-4.8); 0	6.5% (2.8-14.3); 5
<b>Central African Republic</b>											
Bangui (2018)	1.9% (0.7-5.5); 3	48.4% (40.7-56.2); 76	28.7% (22.2-36.2); 45	9.6% (5.9-15.2); 15	0.6% (0.1-3.5); 1	7.6% (4.4-12.9); 12	1.9% (0.7-5.5); 3	0.0% (0.0-2.4); 0	0.0% (0.0-2.4); 0	0.0% (0.0-2.4); 0	1.3% (0.4-4.5); 2
<b>Democratic Republic of the Congo</b>											
Kabare (2018)	2.7% (0.7-9.3); 2	2.7% (0.7-9.3); 2	0.0% (0.0-4.9); 0	0.0% (0.0-4.9); 0	0.0% (0.0-4.9); 0	40.5% (30.1-51.9); 30	54.1% (42.8-64.9); 40	0.0% (0.0-4.9); 0	0.0% (0.0-4.9); 0	0.0% (0.0-4.9); 0	0.0% (0.0-4.9); 0
Karawa (2018)	1.7% (0.3-9.1); 1	51.7% (39.2-64.1); 30	24.1% (15.0-36.5); 14	3.4% (1.0-11.7); 2	0.0% (0.0-6.2); 0	5.2% (1.8-14.1); 3	13.8% (7.2-24.9); 8	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0
Kinshasa (2018)	6.0% (2.6-13.2); 5	1.2% (0.2-6.4); 1	65.5% (54.8-74.8); 55	2.4% (0.7-8.3); 2	0.0% (0.0-4.4); 0	16.7% (10.2-26.1); 14	6.0% (2.6-13.2); 5	0.0% (0.0-4.4); 0	0.0% (0.0-4.4); 0	0.0% (0.0-4.4); 0	2.4% (0.7-8.3); 2
Kisangani (2018)	1.2% (0.2-6.7); 1	7.4% (3.4-15.2); 6	30.9% (21.9-41.6); 25	2.5% (0.7-8.6); 2	0.0% (0.0-4.5); 0	32.1% (22.9-42.9); 26	24.7% (16.6-35.1); 20	1.2% (0.2-6.7); 1	0.0% (0.0-4.5); 0	0.0% (0.0-4.5); 0	0.0% (0.0-4.5); 0
Mbandaka (2018)	0.0% (0.0-6.1); 0	1.7% (0.3-9.0); 1	57.6% (44.9-69.4); 34	0.0% (0.0-6.1); 0	0.0% (0.0-6.1); 0	8.5% (3.7-18.4); 5	30.5% (20.3-43.1); 18	0.0% (0.0-6.1); 0	0.0% (0.0-6.1); 0	0.0% (0.0-6.1); 0	0.0% (0.0-6.1); 0
Pangi (2018)	1.7% (0.3-9.1); 1	5.2% (1.8-14.1); 3	10.3% (4.8-20.8); 6	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	37.9% (26.6-50.8); 22	44.8% (32.7-57.5); 26	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0	0.0% (0.0-6.2); 0
<b>Gabon</b>											
Franceville (2017)	0.0% (0.0-14.3); 0	4.3% (0.8-21.0); 1	82.6% (62.9-93.0); 19	8.7% (2.4-26.8); 2	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	4.3% (0.8-21.0); 1	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0
Libreville (2016)	0.0% (0.0-6.3); 0	5.3% (1.8-14.4); 3	89.5% (78.9-95.1); 51	1.8% (0.3-9.3); 1	0.0% (0.0-6.3); 0	3.5% (1.0-11.9); 2	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0
Oyem (2017)	4.8% (1.9-11.6); 4	7.1% (3.3-14.7); 6	64.3% (53.6-73.7); 54	3.6% (1.2-10.0); 3	0.0% (0.0-4.4); 0	15.5% (9.3-24.7); 13	0.0% (0.0-4.4); 0	0.0% (0.0-4.4); 0	2.4% (0.7-8.3); 2	0.0% (0.0-4.4); 0	2.4% (0.7-8.3); 2
<b>Nigeria</b>											
Port Harcourt (2016)	3.5% (1.0-11.9); 2	7.0% (2.8-16.7); 4	45.6% (33.4-58.4); 26	8.8% (3.8-18.9); 5	3.5% (1.0-11.9); 2	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0	0.0% (0.0-6.3); 0	3.5% (1.0-11.9); 2	1.8% (0.3-9.3); 1	22.8% (13.8-35.2); 13
<b>Republic of the Congo</b>											
Brazzaville (2017)	4.3% (0.8-21.0); 1	0.0% (0.0-14.3); 0	69.6% (49.1-84.4); 16	8.7% (2.4-26.8); 2	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	8.7% (2.4-26.8); 2	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	0.0% (0.0-14.3); 0	8.7% (2.4-26.8); 2

*Pf*drps alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581, and 613. The wild-type amino acid is stated in upper case, with the mutated amino acid in lower case. 95% CIs of proportions were calculated using the Wilson score method without continuity correction. \*Other alleles include IfAKAs, laAKGA, laAKGs, ISgKGA, laAKGs, laAKAA, IfgKAA, and ISngGA.

Table: Prevalence of *pf*drps alleles produced by Sanger sequencing across 18 sites in seven central African countries

was considered only when the corresponding position was genotyped in at least 80% of the samples. Population structure was investigated by principal component analysis using the SNPRelate package in R.

From the reads mapped to the 3D7 reference genome, seven microsatellites were genotyped around the *pfdhps* gene on the samples we sequenced and 109 samples from MalariaGEN covering the *pfdhps* alleles ISgKAA, IagKAA, IaAKAA, vagKAA, and vagKgs, as previously described.<sup>18</sup> At least five sequence reads covering a repeated motif and some nucleotides upstream and downstream of the motif were required to unambiguously interpret the length of the microsatellite.

Per-gene copy number was assessed for 76 *pfdhps* vagKgs-carrying samples in 5427 genes using PlasmocNVScan.<sup>19</sup>

The within-sample *F* statistic (*F*<sub>ws</sub>) was applied to determine whether each sample was monoclonal or polyclonal. The *F*<sub>ws</sub> was calculated using the moimix (version 0.0.2.9001) R package<sup>20</sup> and samples with *F*<sub>ws</sub> of less than 0.95 were considered polyclonal.

#### Genome-wide association study (GWAS)

A GWAS was performed using a script developed by Biogenosis, as previously described.<sup>21</sup> Fisher's exact test was used to identify significant SNP differences between parasite lines carrying or not carrying the *pfdhps* vagKgs allele; and between the different vagKgs sublineages (evidenced by principal component analysis).

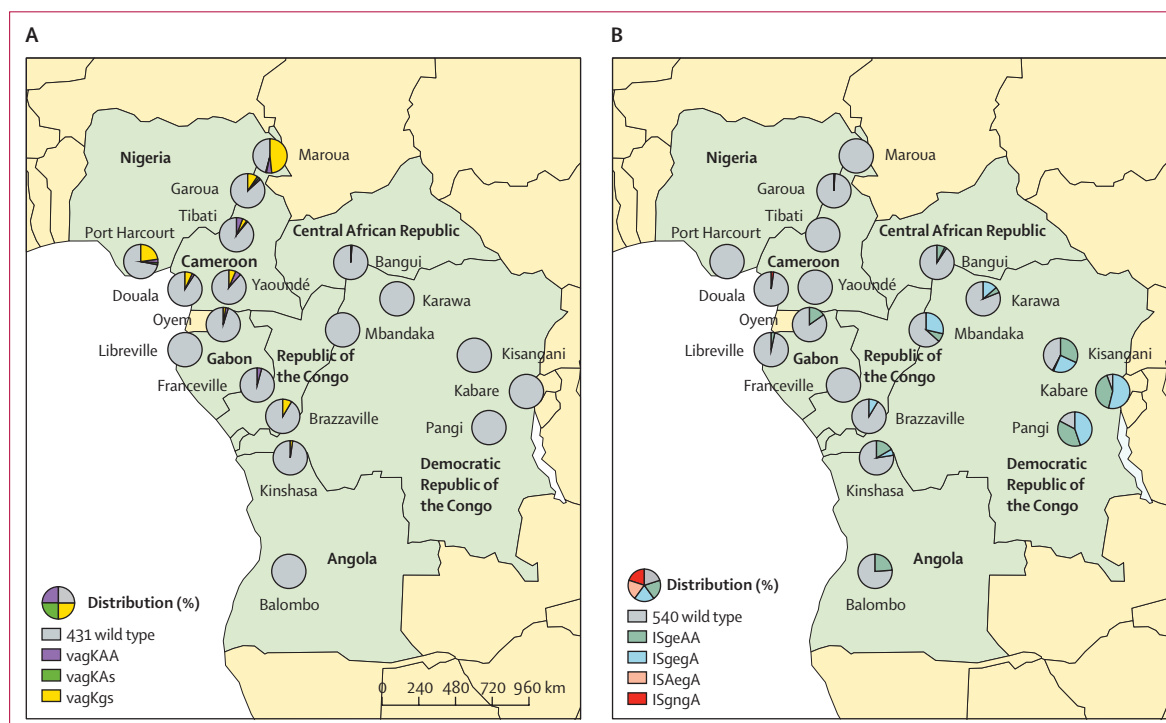
#### Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

#### Results

We evaluated the prevalence of *pfdhfr* and *pfdhps* alleles across 18 sites in seven countries: Angola, Cameroon, Central African Republic, Democratic Republic of the Congo, Gabon, Nigeria, and Republic of the Congo (appendix p 20). Of 1749 samples from patients with malaria at these sites, 1477 sequences were successfully obtained for *pfdhfr* and 1379 for *pfdhps*. Successful genotyping for both genes was determined for 1194 samples.

Six *pfdhfr* alleles were identified, combining mutations at codons 51, 59, 108, and 164 (appendix pp 3–4). The *pfdhfr* CirnI triple mutant allele had a frequency ranging from 80.6% to 100% across all the study sites except in Angola (Balombo; 23.7%). 20 *pfdhps* alleles were observed, combining mutations at codons 431, 436, 437, 540, 581, and 613 (table; appendix p 5). The A437G single mutant (ISgKAA) was the major *pfdhps* allele at more than half of the sites, with a frequency between 39.4% and 89.5%. The K540E mutation was mainly observed in the eastern and southern sites of our study (Democratic Republic of the Congo, Angola, and Oyem in Gabon) with a prevalence ranging from 15.5% to 94.6%.



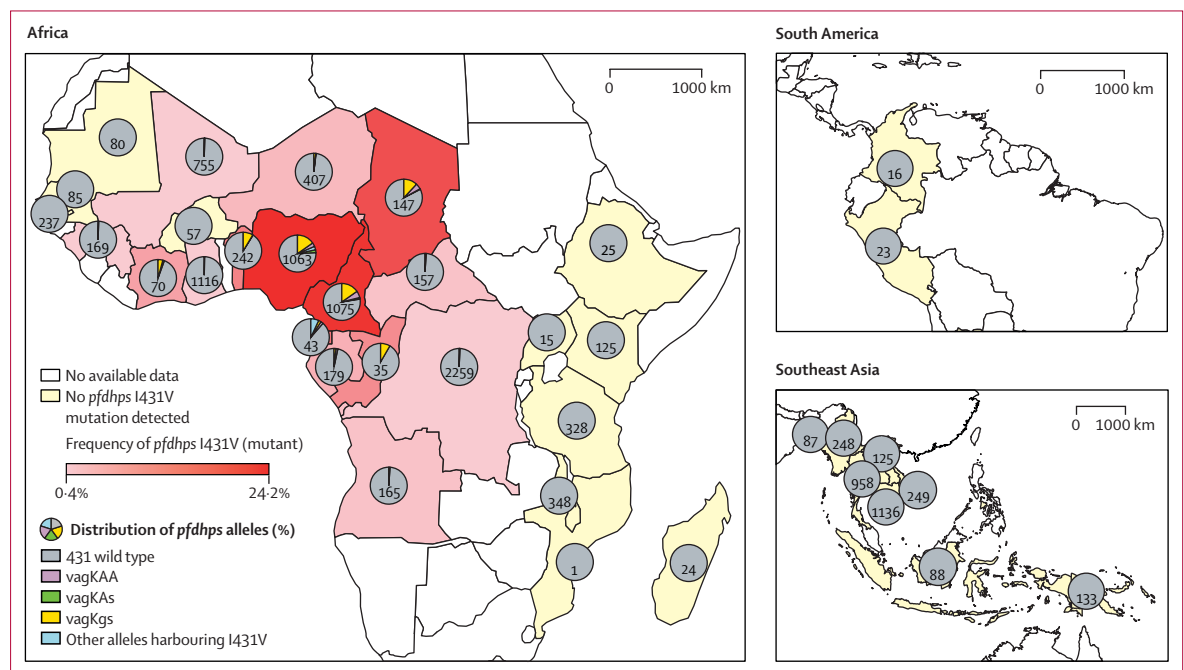
**Figure 1:** Distribution of *pfdhps* alleles containing I431V (A) or K540E/N (B) mutations in the *pfdhps* gene. *Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581, and 613.

The *pfdhps* I431V mutation was heterogeneously distributed among study sites, mostly found in the northwestern sites of our study and especially in Cameroon (from 9.3% in Douala to 54.3% in Maroua) and Nigeria (28.1% in Port Harcourt). By contrast, the frequency of I431V was lower in Republic of the Congo (8.7%), Gabon (up to 4.8% in Oyem), Democratic Republic of the Congo (up to 2.4% in Kinshasa), and Central African Republic (1.3%), with none observed in Angola. Of note, the I431V mutation had a geographical distribution that was the opposite of the K540E mutation and was never observed in combination together (figure 1; appendix p 5). The *vagKgs* quintuple mutant was the most common allele carrying the I431V mutation with a frequency of 78.6%, whereas the two other alleles, *vagKAA* and *vagKAs*, represented only 18.0% and 3.4%, respectively. The *vagKgs* quintuple mutant was observed in combination with the *pfdhfr* CiriI triple mutant allele in 93.6% of samples (appendix p 6). The *vagKgs* quintuple mutant was mainly found in Maroua (Cameroon) and Port Harcourt (Nigeria), representing 48.6% and 22.8% of the *pfdhps* alleles, respectively (table).

After compiling data from our study, MalariaGEN (appendix pp 7–8), and several other studies (appendix pp 9–10), 12 270 *pfdhps* sequences from 36 countries in Africa, South America, and southeast Asia were obtained. The I431V mutation was found in only 617 samples from 15 countries in central and west Africa (figure 2). The frequency of the mutation was

found to be the highest in Cameroon, Nigeria, Chad, and Benin. 12 alleles carrying the I431V mutation were identified. As in our field study, the three major alleles were *vagKgs* (identified in 422 [68.4%] of samples), *vagKAA* (78 [16.9%]), and *vagKAs* (23 [4.5%]).

To better understand the selection process, we characterised microsatellite polymorphisms flanking the *pfdhps* gene at the 0.8 kb locus for 722 samples from this study, at 4.3 kb for 781 samples, and at 7.7 kb for 719 samples. By combining the two most closely related markers (0.8 kb and 4.3 kb),<sup>6</sup> we obtained 53 microsatellite haplotypes across 687 samples (appendix p 11). The *pfdhps* wild-type ISAKAA allele and the S436A single (IaAKAA) mutant had an expected *He* for the 0.8 kb locus close to 1 (0.937 and 0.873, respectively), with 15 and 25 different microsatellite haplotypes, respectively (figure 3; appendix p 12). In contrast with these two alleles, genetic diversity was gradually lowered with the accumulation of *pfdhps* mutations. *He* for the 0.8 kb locus decreased to 0.625 for the A437G single mutant and to 0.515 and 0.402 for the *pfdhps* K540E-associated alleles, ISgeAA and ISgegA, respectively. The loss of diversity was considerably more pronounced for the *pfdhps* alleles associated with the I431V mutation, with *He* values at the 0.8 kb locus ranging from 0.177 (*vagKAA*) to 0.060 (*vagKgs*), suggestive of a recent selection. Of note, the *vagKAA* and *vagKgs* mutants did not share the same microsatellite haplotype, suggesting a different I431V-carrying ancestral mutant lineage depending on the



**Figure 2: Global distribution of the *pfdhps* I431V mutation**

12 270 samples were included, including 1379 from this study (2014–18 period), 6780 from MalariaGEN (2002–15 period), and 4111 from several other studies (appendix pp 9–10). *Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581, and 613. The total numbers of samples from each country are shown on the pie charts.

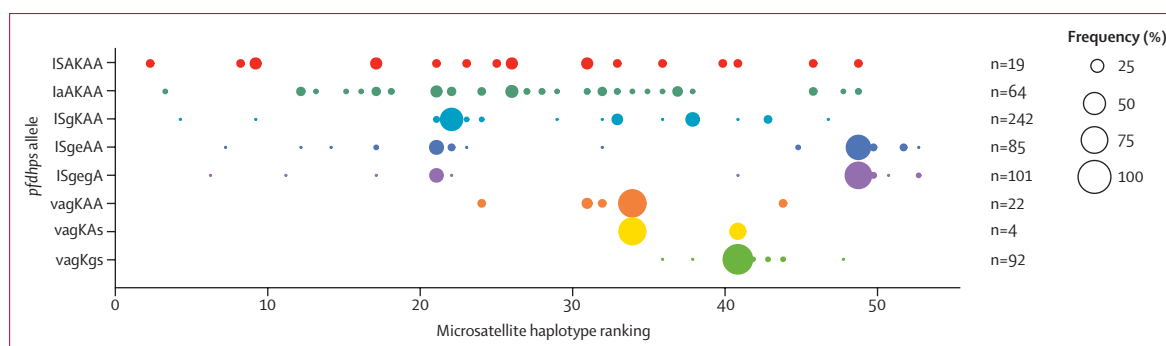
allele, whereas the vagKAs allele shared microsatellite haplotype 34 (75%) with the vagKAA mutant but also microsatellite haplotype 41 (25%) with the vagKgs mutant.

To elucidate the geographical emergence of the I431V mutation, whole genomes of 18 *pfdhps* I431V isolates (including 16 with the vagKgs allele) from this study were sequenced and their genetic diversity was compared to 260 samples retrieved from MalariaGEN collections encompassing 60 samples from Asia, ten from Oceania, 20 from South America, and 170 from Africa (appendix pp 13–14). Using 17 380 high-quality SNPs located in a range of 100 kb upstream and downstream of *pfdhps*, the discriminant analysis of principal components highlighted distinct genetic backgrounds between Africa, Asia, South America, and Oceania. All the samples carrying the *pfdhps* I431V mutation clustered with all other African samples (figure 4A), confirming a local emergence of the I431V mutation in Africa.

To further explore the genetic diversity of vagKgs mutants, a GWAS based on the presence (n=92) or absence (n=484) of the vagKgs allele and covering a total of 2 217 669 SNPs across the 14 *P falciparum* chromosomes identified only one locus showing signs of selection (figure 4B). This region was located between positions 500 000 and 550 000 of chromosome 8 and included the *pfdhps* gene and its 5' region. Similarly, the analysis of the extended haplotype homozygosity around the *pfdhps* gene and centred on the I431V mutation showed that parasites carrying this mutation evolve under positive selection (appendix p 21). The principal component analysis of 12 667 SNPs located in a range of 50 kb upstream or downstream of *pfdhps* revealed two distinct vagKgs populations (figure 4C): Group 1 (GP1) mainly represented by the samples we sequenced and GP2 almost exclusively consisting of parasites from MalariaGEN data. The vagKgs samples in the core of the distribution were mostly polyclonal, explaining why they did not cluster with either GP1 or GP2 (appendix pp 15–17). The GP1 and GP2 patterns were not explained by the

geographical origin (country or site) of the samples, the time of collection, or the multiplicity of infection (appendix p 22). Moreover, performing principal component analyses on SNPs located on other chromosomes of *P falciparum* or in another region of chromosome 8 distant from *pfdhps* failed to distinguish the vagKgs (either GP1 or GP2) from the other samples (appendix p 23), consistent with the aforementioned GWAS. To better understand the genetic difference between GP1 and GP2, we explored seven microsatellites around the *pfdhps* gene (appendix p 24). Four microsatellites were fully identical (the three loci located downstream of the *pfdhps* gene and the closest locus upstream of the *pfdhps* gene), whereas the other three microsatellites, located furthest upstream of *pfdhps*, were different. Additionally, we performed a GWAS between GP1 and GP2 (using only monoclonal samples) and observed that more than 75% of differential SNPs were located in the 50 kb upstream of *pfdhps* (appendix p 25). Such a result suggests that GP1 and GP2 parasites shared the same genetic background, consistent with a single emergence of the vagKgs allele, whereas the strong difference upstream of *pfdhps* could be the result of a recombination event after the vagKgs allele selection process.

To investigate whether vagKgs-carrying isolates harboured compensatory or selection-enhancing mutations, we studied polymorphism in the 11 genes present in the 50-kb region at the 5' end of *pfdhps* identified by GWAS (figure 4D). When focusing only on non-synonymous mutations from the GWAS, in addition to SNPs in the *pfdhps*, three codons were notable: SNP Q169H in the ATP-dependent RNA helicase DBP1, SNP E789G in the JmjC domain-containing protein 1, and SNP K68N in a conserved *Plasmodium* protein of unknown function which is always found as wild type (K68) in the vagKgs group (appendix pp 18–19). These three genes are not known to be involved in metabolic pathways that might lead to sulfadoxine–pyrimethamine resistance. Furthermore, we did not detect any amplified gene specific to vagKgs-carrying samples (Figure 4E)



**Figure 3: Frequency of the microsatellite haplotypes associated with wild-type *pfdhps* and some mutant alleles**

Microsatellite haplotypes have been ranked first according to allele size at locus 0.8 kb, then by allele size at locus 4.3 kb and listed along the x-axis. *Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581, and 613. The wild-type amino acid is stated in upper case, with the mutated amino acid in lower case.

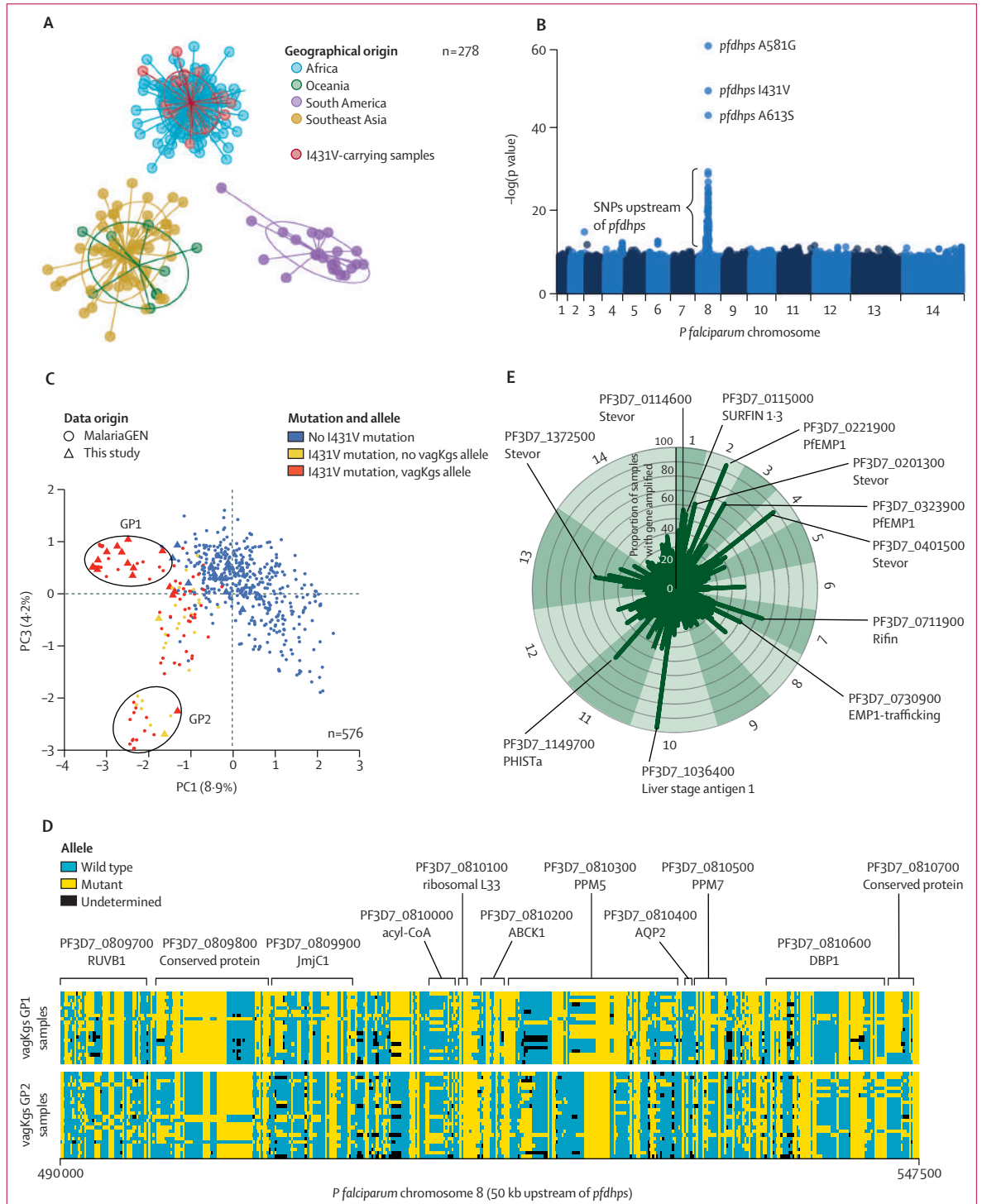
except the liver stage antigen 1 (PF3D7\_1036400), which is commonly amplified in isolates.<sup>22</sup>

Our conclusion is that the 50-kb location of the 5' end of the *vagKgs* allele is associated with a hitchhiking effect. The appearance of the *pfdhps* *vagKgs* allele does not depend on any specific genetic background,

stabilising compensatory mutation, or gene amplification.

### Discussion

With a steady increase in resistance to sulfadoxine-pyrimethamine compromising the effectiveness of



intermittent preventive treatment in pregnancy and seasonal malaria chemoprevention, regular surveys on the efficacy of these policies and monitoring of molecular markers of resistance are essential. The first part of this study explored the geographical distribution of *pfdhps* and *pfdhfr* mutations by collecting more than 1500 samples across most central African countries, an area for which there are much fewer data than in western, eastern, or southern Africa. Previous studies<sup>4</sup> and our results show that the prevalence of the *pfdhfr* CirnI allele is now fixed at a very high level (>95%) in southeastern Nigeria, southern Cameroon, and Gabon. Elsewhere, the increased frequency of this allele was observed in a concentric progression with values ranging from 80% to 90%, except in Balombo, Angola (23.7%).

In southeastern Nigeria, southern Cameroon, and Gabon, we also observed increased prevalence of the *pfdhps* A437G mutation at 80–95%, alone or combined with S436A, forming the ISgKAA or IagKAA alleles. These *pfdhfr*/*pfdhps* haplotypes, CirnI/ISgKAA or CirnI/IagKAA, confer the first level of resistance to sulfadoxine–pyrimethamine<sup>23</sup> but do not impact the efficacy of intermittent preventive treatment in pregnancy in terms of low birthweight.<sup>24</sup> However, the impact on maternal anaemia and parasitaemia is not well known. The efficacy of seasonal malaria chemoprevention does not seem to be affected by these genotypes,<sup>9</sup> but such data need to be confirmed. By contrast, the additional *pfdhps* K540E mutation reduces the efficacy of both intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy and seasonal malaria chemoprevention,<sup>25,26</sup> and the additional *pfdhps* A581G mutation enhances this resistance.<sup>24,27</sup> Intermittent preventive treatment in

pregnancy with sulfadoxine–pyrimethamine is estimated to be no longer effective when the prevalence of K540E is greater than 90% and of A581G is greater than 10%.<sup>24</sup> Our study showed a very high level of resistance in Kabare (Democratic Republic of the Congo; 94.6% for K540E and 54.1% for A581G), consistent with the prevalence previously observed in neighbouring countries (Rwanda, Uganda, and Tanzania).<sup>4</sup> Even if the prevalence of these mutations decreased when moving towards the west, they have considerably increased since previous surveys.<sup>4,28</sup> This trend is likely to dramatically reduce the efficacy of intermittent preventive treatment in pregnancy with sulfadoxine–pyrimethamine in one of the most malaria-affected areas of Africa.

Our survey and analysis of the MalariaGEN dataset and several other studies identified a high frequency of the new *pfdhps* I431V mutation in Cameroon, Nigeria, Chad, and Benin. Although our study did not identify the I431V mutation in Angola (Balombo), the low frequency observed in samples collected in 2019 from Zaire province (2.9%) indicated the continuous spread of this mutation.<sup>29</sup> High prevalence has already been described in Nigeria<sup>30</sup> as well as Chad<sup>9</sup> and this mutation is also found in several west and central African countries, but has never been observed elsewhere in Africa or on other continents. This distribution favours an emergence having occurred in one of these four countries.

Analysis of the evolution of I431V over time is scarce. It is difficult to assess whether the lack of data is due to the absence of the I431V mutation in the field or to an absence of its screening. Furthermore, studies either do not screen for the I431V mutation or are based on non-sequencing methods. Nevertheless, analysis of data retrieved from the literature and from MalariaGEN (based on whole-genome analysis) showed the first sporadic detection of this substitution from 2007 in Nigeria.<sup>7</sup> Moreover, the low level of genetic diversity also supports the idea of a recent selection of the I431V mutation and clonal emergence of the *vagKgs* allele.

In the absence of compensatory mutations (SNPs or copy number variations) or a related genetic background, we can infer that the selection of the *vagKgs* allele is solely based on its advantageous phenotype. Given that mutations in the *pfdhfr* and *pfdhps* genes are positively correlated with increasing levels of sulfadoxine–pyrimethamine resistance,<sup>31</sup> we can reasonably expect that this new haplotype would confer a high level of resistance to sulfadoxine–pyrimethamine and has been selected due to extensive use of sulfadoxine–pyrimethamine for intermittent preventive treatment in pregnancy. To date, this hypothesis remains speculative in the absence of clinical studies. However, a study conducted in Cameroon in 2020 showed an over-representation of the CirnI/*vagKgs* haplotype in the group of pregnant women with acute malaria receiving intermittent preventive treatment in pregnancy with sulfadoxine–pyrimethamine compared with those who

#### Figure 4: Genetic analyses of *pfdhps* I431V-carrying samples

(A) Geographical origin of the I431V mutation based on a discriminant analysis of principal components. The analysis was performed using 17 380 SNPs located in a range of 100 kb upstream and downstream of *pfdhps*, in 260 samples from different continents (MalariaGEN data) and 18 *pfdhps* I431V-carrying mutants from this study. (B) Manhattan plot showing the significance of SNP association in the genome-wide association study. Each point represents one of the 2 217 669 SNPs in a set of 576 samples (92 with the *vagKgs* allele and 484 without), coloured according to chromosome. The y-axis corresponds to the  $-\log(p \text{ value})$  for the SNP association calculated using Fisher's exact test. (C) Population structure harbouring different *pfdhps* alleles based on a principal component analysis. We focused on African countries with at least one *vagKgs*-carrying isolate in the MalariaGEN database. 576 samples were included (89 from Benin, 180 from Cameroon, 100 from Ghana, 70 from Côte d'Ivoire, 100 from Mali, and 37 from Nigeria) covering 12 667 SNPs located in a range of 50 kb upstream or downstream of *pfdhps*. 92 samples carried the *pfdhps* *vagKgs* allele and 113 had the I431V mutation. (D) Comparison of two *vagKgs*-carrying GP1 and GP2 lineages based on 11 genes upstream of *pfdhps*. Each cell represents a single SNP. Each row corresponds to one isolate. Only monoclonal samples were included for this analysis. (E) Estimation of per-gene copy number for 76 *pfdhps* *vagKgs*-carrying samples using the PlasmocNVScan program. Each line represents one of the 5427 genes and corresponds to the percentage of samples with a gene amplification. Numbers around the outside of the circle indicate the *P. falciparum* chromosome. The name and identifier of the gene is indicated when the percentage of samples is 50% or more. GP=Group. PC=principal component. *P. falciparum*=*Plasmodium falciparum*. SNP=single nucleotide polymorphism.

did not receive prophylaxis, suggesting a high level of resistance to sulfadoxine–pyrimethamine for this mutant.<sup>32</sup> By contrast, Beshir and colleagues<sup>9</sup> conducted a molecular surveillance study of the seasonal malaria chemoprevention policy in the Sahel region and found no evidence of increased prevalence of the *vagKgs* allele in the target population at 2-year intervals (2016 and 2018) in Chad, Niger, and Nigeria, with an excellent efficacy of the prophylaxis. Unlike mass treatment that relies solely on sulfadoxine–pyrimethamine, this study evaluated the efficacy of seasonal malaria chemoprevention using a combination of sulfadoxine–pyrimethamine and amodiaquine. The use of this drug combination (ie, the presence of amodiaquine) might explain the absence of a selection of parasites that are hyper-resistant to sulfadoxine–pyrimethamine.

Hypothesising that selection of the *vagKgs* allele is solely related to sulfadoxine–pyrimethamine use, as suggested by the results of our GWAS, is somewhat surprising considering that emergence occurred in Nigeria or Cameroon, in areas known to have had great difficulties for several years (lack of state, poverty, and armed conflicts) that have compromised the implementation of intermittent preventive treatment in pregnancy and seasonal malaria chemoprevention.<sup>33</sup> However, it cannot be ruled out that I431V is a compensatory mutation that would ensure greater performance of the PfDHPS enzyme in the presence of resistance mutations (A437G, A581G, A613S); in this scenario, it could give rise to better fitness of resistant parasites even in the absence of selection pressure by sulfadoxine–pyrimethamine.

Of note, the combination of K540E and I431V mutations has not been observed in our study nor in any published data, suggesting a high fitness cost. The *vagKgs* haplotype could be to central and western Africa what the ISgeGA haplotype is to eastern and southern Africa: a super-resistant parasite, as defined by Naidoo and colleagues.<sup>4</sup> Therefore, further investigations are needed to clarify the extent to which this *vagKgs* allele contributes to the reduced efficacy of sulfadoxine–pyrimethamine in intermittent preventive treatment in pregnancy or seasonal malaria chemoprevention campaigns. Nevertheless, this study emphasises that the use of sulfadoxine–pyrimethamine selects for mutations, meaning that switching to drug combinations is recommended rather than using sulfadoxine–pyrimethamine alone.

#### Contributors

RC, SMé, FA, and AB conceptualised and designed the study. SMé and AB wrote the protocols. SN, DMM, EN, CEEM, MKBA, TYM, SMa, JA, EK, and JBL-D organised sample collection. DMY, P-AR, J-PL, LA, LCK, DFM, DPMM, and JBL-D performed sample collection. EG, RC, SMé, MdM, A-LO, and FA performed the laboratory experiments. EG, RC, SMé, MdM, OC, XI, FA, and AB analysed the data. EG, RC, SMé, FA, and AB drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript. RC, SMé, and AB had full access to all the data in the study, and AB had final responsibility for the decision to submit for publication.

#### Declaration of interests

We declare no competing interests.

#### Data sharing

The study protocols and dataset will be made available upon reasonable request made to the corresponding author.

#### Acknowledgments

The study was funded by Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases. We thank all the personnel of the health-care centres and all participants, without whom this work would not have been possible.

Editorial note: The Lancet Group takes a neutral position with respect to territorial claims in published text, tables, maps, and institutional affiliations.

#### References

- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 93–104.
- WHO. World malaria report 2022. Dec 8, 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898> (accessed Feb 15, 2023).
- Cairns ME, Sagara I, Zongo I, et al. Evaluation of seasonal malaria chemoprevention in two areas of intense seasonal malaria transmission: secondary analysis of a household-randomised, placebo-controlled trial in Houndé District, Burkina Faso and Bougouni District, Mali. *PLoS Med* 2020; 17: e1003214.
- Naidoo I, Roper C. Mapping ‘partially resistant’, ‘fully resistant’, and ‘super resistant’ malaria. *Trends Parasitol* 2013; 29: 505–15.
- Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 2004; 305: 1124.
- Pearce RJ, Pota H, Evehe M-SB, et al. Multiple origins and regional dispersal of resistant *dhps* in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med* 2009; 6: e1000055.
- Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ, et al. Novel *pf dhps* haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3405–10.
- Chauvin P, Menard S, Iriart X, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant *pf dhfr/pf dhps* alleles. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2566–71.
- Beshir KB, Muwanguzi J, Nader J, et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* haplotypes associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries: a genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis* 2023; 23: 361–70.
- WHO. Management of severe malaria: a practical handbook. Geneva: World Health Organization, 2013.
- Roper C, Pearce R, Bredenkamp B, et al. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet* 2003; 361: 1174–81.
- Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 1995; 86: 485–86.
- Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, et al. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. *Malar J* 2016; 15: 597.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25: 1754–60.
- Ahouidi A, Ali M, Almagro-Garcia J, et al. An open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 7,000 worldwide samples. *Wellcome Open Res* 2021; 6: 42.
- Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 2011; 27: 3070–71.
- Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010; 26: 841–42.
- Alam MT, Vinayak S, Congpuong K, et al. Tracking origins and spread of sulfadoxine-resistant *Plasmodium falciparum* dhps alleles in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 155–64.
- Beghain J, Langlois A-C, Legrand E, et al. *Plasmodium* copy number variation scan: gene copy numbers evaluation in haploid genomes. *Malar J* 2016; 15: 206.

- 20 Lee S, Bahlo M. moimix: an R package for assessing clonality in high-throughput sequencing data. 2016. <https://github.com/bahlolab/moimix> (accessed Oct 5, 2023).
- 21 Witkowski B, Duru V, Khim N, et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 174–83.
- 22 Claessens A, Harris LM, Stanojic S, et al. RecQ helicases in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* affect genome stability, gene expression patterns and DNA replication dynamics. *PLoS Genet* 2018; **14**: e1007490.
- 23 Naidoo I, Roper C. Drug resistance maps to guide intermittent preventive treatment of malaria in African infants. *Parasitology* 2011; **138**: 1469–79.
- 24 van Eijk AM, Larsen DA, Kayentao K, et al. Effect of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine–pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: 546–56.
- 25 Gosling RD, Gesase S, Mosha JF, et al. Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; **374**: 1521–32.
- 26 Desai M, Gutman J, Taylor SM, et al. Impact of sulfadoxine–pyrimethamine resistance on effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy at clearing infections and preventing low birth weight. *Clin Infect Dis* 2016; **62**: 323–33.
- 27 WHO. WHO guidelines for malaria. March 14, 2023. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1493946/retrieve> (accessed April 10, 2023).
- 28 Deutsch-Feldman M, Aydemir O, Carrel M, et al. The changing landscape of *Plasmodium falciparum* drug resistance in the Democratic Republic of Congo. *BMC Infect Dis* 2019; **19**: 872.
- 29 Rosillo SR, Dimbu PR, Cândido ALM, et al. Molecular markers of sulfadoxine–pyrimethamine resistance in samples from children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* at three sites in Angola in 2019. *Antimicrob Agents Chemother* 2023; **67**: e0160122.
- 30 Zhao D, Zhang H, Ji P, et al. Surveillance of antimalarial drug-resistance genes in imported *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria in Henan, China, 2012–2019. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**: 644576.
- 31 Plowe CV. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; **103** (suppl 1): S11–14.
- 32 Cohen O, Guemas E, Menard S, et al. Effect of sulfadoxine–pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on selection of the new *P. falciparum dhps* quintuple mutant carrying the I431V mutation. *J Antimicrob Chemother* 2023; **78**: 665–68.
- 33 Ndu A, Mbachu C, Anitube O, Ezeoke U. Inequities in the use of sulphadoxine–pyrimethamine for malaria prophylaxis during pregnancy in Nigeria. *Malawi Med J* 2020; **32**: 45–51.

# THE LANCET Microbe

## Supplementary appendix

This appendix formed part of the original submission and has been peer reviewed. We post it as supplied by the authors.

Supplement to: Guémas E, Coppée R, Ménard S, et al. Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study. *Lancet Microbe* 2023; published online Oct 18. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00211-2).

**Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Central Africa: a cross-sectional study**

Emilie Guémas<sup>1,2,3#</sup>, Romain Coppée<sup>4#</sup>, Sandie Ménard<sup>1#</sup>, Milena du Manoir<sup>1</sup>, Sandrine Nsango<sup>5,6</sup>, Dieudonné Makaba Mvumbi<sup>7,8</sup>, Emmanuel Nakoune<sup>9</sup>, Carole Eboumbou<sup>5,6</sup>, Marielle Karine Bouyou Akotet<sup>10,11</sup>, Tاتفeng Youtchou Mirabeau<sup>12</sup>, Sylvie Manguin<sup>13</sup>, Doudou Malekita Yobi<sup>7</sup>, Jean Akiana<sup>14</sup>, Lady Charlène Kouna<sup>15</sup>, Denise Patricia Mawili Mboumba<sup>10,11</sup>, Dominique Fatima Voumbo-Matoumona<sup>14,15</sup>, Alliance-Laure Otam<sup>1</sup>, Pierre-Alain Rubbo<sup>9</sup>, Jean-Pierre Lombart<sup>9</sup>, Elisabeth Kwanai<sup>16</sup>, Olivia Cohen<sup>1</sup>, Xavier Iriart<sup>1,2</sup>, Lawrence Ayong<sup>6</sup>, Jean Bernard Lekana-Douki<sup>15</sup>, Frédéric Ariey<sup>17</sup>, Antoine Berry<sup>1,2\$</sup>

## Table of contents:

Supplementary Method 1. Variant calling and SNP hard-filtering .....	2
Supplementary Table 1: Prevalence of <i>pfdhfr</i> alleles across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country. ....	3
Supplementary Table 2: Prevalence of mutations at different codons in <i>pfdhfr</i> across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country. ....	4
Supplementary Table 3: Prevalence of mutations at different codons in <i>pfdhps</i> across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country. ....	5
Supplementary Table 4: Prevalence of <i>pfdhps</i> allele depending on <i>pfdhfr</i> allele at all study sites.....	6
Supplementary Table 5: Number of samples harbouring the <i>pfdhps</i> I431V mutation for each site and country from MalariaGEN data .....	7
Supplementary Table 6: Extensive review of the literature searching for studies investigating the <i>pfdhps</i> I431V mutation .....	7
Supplementary Table 7: Microsatellite haplotypes ranked, first according to allele size at locus 0.8 kb and then by allele size at locus 4.3 kb.....	11
Supplementary Table 8: Expected heterozygosity ( $H_e$ ) depending on <i>pfdhps</i> allele for all study sites.....	12
Supplementary Table 9: Accession ID of MalariaGEN samples included for the discriminant analysis of principal components (DAPC). ....	13
Supplementary Table 10: Number of nucleotide deletions/insertions for seven microsatellites around the <i>pfdhps</i> gene. ....	15
Supplementary Table 11: GWAS analysis based on the presence or absence of <i>vagKgs</i> allele focusing on the non-synonymous SNPs across 11 genes in the 50kb region of the 5' end of <i>pfdhps</i> .....	18
Supplementary Figure 1: Eighteen study sites covering six Central African countries and one neighbouring country. ....	20
Supplementary Figure 2: Extended haplotype homozygosity around the codon 431 of the <i>pfdhps</i> gene on chromosome 8. ....	21
Supplementary Figure 3: Population structure of different <i>pfdhps</i> alleles based on a principal component analysis, according to (A) country, (B) year of collection, or (C) complexity of infection. ....	22
Supplementary Figure 4: Population structure of different <i>pfdhps</i> alleles based on a principal component analysis from different chromosomal regions.....	23
Supplementary Figure 5: Location of the seven microsatellites investigated using whole genome sequence data. ....	24
Supplementary Figure 6: Manhattan plot showing the significance of SNP association in the GWAS comparing GP1 and GP2 isolates. ....	25

### **Supplementary Method 1. Variant calling and SNP hard-filtering**

Variant calling was performed following GATK best practices (version 4.1.8). First, duplicate reads were removed using Picard MarkDuplicates. The Picard tool AddOrReplaceReadGroups was implemented to assign all the reads to a single new read-group. GATK BaseRecalibrator was used to optimise the read alignment with the PASS variants from the Pf crosses 1.0 release from MalariaGEN consortium as a set of known sites (<http://www.malariagen.net/data/pf-crosses-1.0>) and applied using GATK ApplyBQSR. Potential SNPs and indels were discovered by running the GATK HaplotypeCaller independently across each isolate and genotyped for each of the 16 reference sequences (14 chromosomes, 1 apicoplast and 1 mitochondria) using CombineGVCFs and GenotypeGVCFs, respectively. SNPs and indels were filtered using GATK VariantRecalibrator that assigns to each variant a quality score (named VQSLOD) from the PASS variants of the Pf crosses 1.0 as a training set with a prior of 15.0 using the following parameters: -mode SNP -an QD -an FS -an SOR -an DP --max-gaussians 8 -mq-cap 70. A recalibration was applied using GATK ApplyVQSR with a truth sensitivity filter level fixed at 99.0%. SNPs with a VQSLOD score  $\leq 0$  were filtered out using GATK VariantFiltration to retain only high-quality SNPs. Functional annotations were applied using SnpEff v4.1. Polymorphic sites within hypervariable, telomeric and repetitive sequence regions were excluded, alongside genomic regions that were outside of the core genome using VCFtools v0.1.16. Finally, only biallelic SNPs were retained using GATK SelectVariants.

**Supplementary Table 1: Prevalence of *pfdhfr* alleles across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country.**

Country	Site	No. of <i>pfdhfr</i> sequences	<i>pfdhfr</i> alleles, % (n) [95% CI]					
			CNCsI	CNCnI	CNrml	CiCnI	CirnI	Cirnl
Angola	Balombo	38	0.0 (0) [0.0-9.2]	0.0 (0) [0.0-9.2]	0.0 (0) [0.0-9.2]	76.3 (29) [60.8-87.0]	23.7 (9) [13.0-39.2]	0.0 (0) [0.0-9.2]
	Douala	61	0.0 (0) [0.0-5.9]	0.0 (0) [0.0-5.9]	0.0 (0) [0.0-5.9]	0.0 (0) [0.0-5.9]	100.0 (61) [94.1-100]	0.0 (0) [0.0-5.9]
Cameroon	Garoua	108	5.6 (6) [2.6-11.6]	2.8 (3) [0.9-7.9]	9.3 (10) [5.1-16.2]	1.9 (2) [0.5-6.5]	80.6 (87) [72.1-86.9]	0.0 (0) [0.0-3.4]
	Maroua	136	0.7 (1) [0.1-4.0]	0.7 (1) [0.1-4.0]	5.1 (7) [2.5-10.2]	2.9 (4) [1.1-7.3]	90.4 (123) [84.3-94.3]	0.0 (0) [0.0-2.7]
	Tibati	114	2.6 (3) [0.9-7.5]	0.0 (0) [0.0-3.3]	4.4 (5) [1.9-9.9]	4.4 (5) [1.9-9.9]	88.6 (101) [81.5-93.2]	0.0 (0) [0.0-3.3]
	Yaoundé	99	0.0 (0) [0.0-3.7]	0.0 (0) [0.0-3.7]	3.0 (3) [1.0-8.5]	2.0 (2) [0.6-7.1]	94.9 (94) [88.7-97.8]	0.0 (0) [0.0-3.7]
	Bangui	195	1.5 (3) [0.5-4.4]	0.0 (0) [0.0-1.9]	6.7 (13) [3.9-11.1]	5.1 (10) [2.8-9.2]	86.7 (169) [81.2-90.7]	0.0 (0) [0.0-1.9]
Congo	Brazzaville	28	3.6 (1) [0.6-17.7]	0.0 (0) [0.0-12.1]	3.6 (1) [0.6-17.7]	3.6 (1) [0.6-17.7]	89.3 (25) [72.8-96.3]	0.0 (0) [0.0-12.1]
	Kabare	78	0.0 (0) [0.0-4.7]	0.0 (0) [0.0-4.7]	0.0 (0) [0.0-4.7]	16.7 (13) [10.0-26.5]	83.3 (65) [73.5-90.0]	0.0 (0) [0.0-4.7]
Democratic Republic of Congo	Karawa	67	3.0 (2) [0.8-10.2]	1.5 (1) [0.3-8.0]	1.5 (1) [0.3-8.0]	13.4 (9) [7.2-23.6]	80.6 (54) [69.6-88.3]	0.0 (0) [0.0-5.4]
	Kinshasa	89	1.1 (1) [0.2-6.1]	0.0 (0) [0.0-4.1]	0.0 (0) [0.0-4.1]	10.1 (9) [5.4-18.1]	88.8 (79) [80.5-93.8]	0.0 (0) [0.0-4.1]
	Kisangani	93	0.0 (0) [0.0-4.0]	0.0 (0) [0.0-4.0]	0.0 (0) [0.0-4.0]	14.0 (13) [8.4-22.5]	84.9 (79) [76.3-90.8]	1.1 (1) [0.2-5.8]
	Mbandaka	73	0.0 (0) [0.0-5.0]	0.0 (0) [0.0-5.0]	0.0 (0) [0.0-5.0]	8.2 (6) [3.8-16.8]	91.8 (67) [83.2-96.2]	0.0 (0) [0.0-5.0]
	Pangi	63	0.0 (0) [0.0-5.7]	0.0 (0) [0.0-5.7]	0.0 (0) [0.0-5.7]	9.5 (6) [4.4-19.3]	90.5 (57) [80.7-95.6]	0.0 (0) [0.0-5.7]
	Franceville	30	0.0 (0) [0.0-11.4]	0.0 (0) [0.0-11.4]	0.0 (0) [0.0-11.4]	3.3 (1) [0.6-16.7]	96.7 (29) [83.3-99.4]	0.0 (0) [0.0-11.4]
Gabon	Libreville	63	0.0 (0) [0.0-5.7]	0.0 (0) [0.0-5.7]	0.0 (0) [0.0-5.7]	1.6 (1) [0.3-8.5]	98.4 (62) [91.5-99.7]	0.0 (0) [0.0-5.7]
	Oyem	91	0.0 (0) [0.0-4.1]	1.1 (1) [0.2-6.0]	0.0 (0) [0.0-4.1]	0.0 (0) [0.0-4.1]	98.9 (90) [94.0-99.8]	0.0 (0) [0.0-4.1]
Nigeria	Port Harcourt	51	0.0 (0) [0.0-7.0]	0.0 (0) [0.0-7.0]	0.0 (0) [0.0-7.0]	0.0 (0) [0.0-7.0]	100.0 (51) [93.0-100]	0.0 (0) [0.0-7.0]

*Pfdhfr* alleles are named according to the amino acid present at positions 50, 51, 59, 108 and 164. The wild-type amino acid is stated in upper case, with the mutated amino acid in lower case. Ninety-five percent confidence intervals (CIs) of proportions were calculated using Wilson score method without continuity correction.

**Supplementary Table 2: Prevalence of mutations at different codons in *pfdhfr* across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country.**

Country	Site	No. of <i>pfdhfr</i> sequences	<i>pfdhfr</i> mutation, % (n) [95% CI]				
			C50R	N51I	C59R	S108N	I164L
Angola	Balombo	38	0.0 (0) [0.0-9.2]	100 (38) [90.8-100]	23.7 (9) [13.0-39.2]	100 (38) [90.8-100]	0.0 (0) [0.0-9.2]
	Douala	61	0.0 (0) [0.0-5.9]	100 (61) [94.1-100]	100 (61) [94.1-100]	100 (61) [94.1-100]	0.0 (0) [0.0-5.9]
Cameroon	Garoua	108	0.0 (0) [0.0-3.4]	82.4 (89) [74.2-88.4]	89.8 (97) [82.7-94.2]	94.4 (102) [88.4-97.4]	0.0 (0) [0.0-3.4]
	Maroua	136	0.0 (0) [0.0-2.7]	93.4 (127) [87.9-96.5]	95.6 (130) [90.7-98.0]	99.3 (135) [96.0-99.9]	0.0 (0) [0.0-2.7]
	Tibati	114	0.0 (0) [0.0-3.3]	93.0 (106) [86.8-96.4]	93.0 (106) [86.8-96.4]	97.4 (111) [92.5-99.1]	0.0 (0) [0.0-3.3]
	Yaoundé	99	0.0 (0) [0.0-3.7]	97.0 (96) [91.5-99.0]	98.0 (97) [92.9-99.4]	100 (99) [96.3-100]	0.0 (0) [0.0-3.7]
Central African Republic	Bangui	195	0.0 (0) [0.0-1.9]	91.8 (179) [87.1-94.9]	93.3 (182) [88.9-96.1]	98.5 (192) [95.6-99.5]	0.0 (0) [0.0-1.9]
Congo	Brazzaville	28	0.0 (0) [0.0-12.1]	92.9 (26) [77.4-98.0]	92.9 (26) [77.4-98.0]	96.4 (27) [82.3-99.4]	0.0 (0) [0.0-12.1]
	Kabare	78	0.0 (0) [0.0-4.7]	100 (78) [95.3-100]	83.3 (65) [73.5-90.0]	100 (78) [95.3-100]	0.0 (0) [0.0-4.7]
Democratic Republic of Congo	Karawa	67	0.0 (0) [0.0-5.4]	94.0 (63) [85.6-97.7]	82.1 (55) [71.3-89.4]	97.0 (65) [89.8-99.2]	0.0 (0) [0.0-5.4]
	Kinshasa	89	0.0 (0) [0.0-4.1]	98.9 (88) [93.9-99.8]	88.8 (79) [80.5-93.8]	98.9 (88) [93.9-99.8]	0.0 (0) [0.0-4.1]
	Kisangani	93	0.0 (0) [0.0-4.0]	100 (93) [96.0-100]	86.0 (80) [77.5-91.6]	100 (93) [96.0-100]	1.1 (1) [0.2-5.8]
	Mbandaka	73	0.0 (0) [0.0-5.0]	100 (73) [95.0-100]	91.8 (67) [83.2-96.2]	100 (73) [95.0-100]	0.0 (0) [0.0-5.0]
	Pangi	63	0.0 (0) [0.0-5.7]	100 (63) [94.3-100]	90.5 (57) [80.7-95.6]	100 (63) [94.3-100]	0.0 (0) [0.0-5.7]
Gabon	Franceville	30	0.0 (0) [0.0-11.4]	100 (30) [88.6-100]	96.7 (29) [83.3-99.4]	100 (30) [88.6-100]	0.0 (0) [0.0-11.4]
	Libreville	63	0.0 (0) [0.0-5.7]	100 (63) [94.3-100]	98.4 (62) [91.5-99.7]	100 (63) [94.3-100]	0.0 (0) [0.0-5.7]
	Oyem	91	0.0 (0) [0.0-4.1]	98.9 (90) [94.0-99.8]	98.9 (90) [94.0-99.8]	100 (91) [95.9-100]	0.0 (0) [0.0-4.1]
Nigeria	Port Harcourt	51	0.0 (0) [0.0-7.0]	100 (51) [93.0-100]	100 (51) [93.0-100]	100 (51) [93.0-100]	0.0 (0) [0.0-7.0]

Ninety-five percent confidence intervals (CIs) of proportions were calculated using Wilson score method without continuity correction.

**Supplementary Table 3: Prevalence of mutations at different codons in *pfdhps* across 18 sites covering six Central African countries and one neighbouring country.**

Country	Site	No. of <i>pfdhps</i> sequences	<i>pfdhps</i> mutation, % (n) [95% CI]					
			I431V	S436A	A437G	K540E	A581G	A613S
Angola	Balombo	58	0.0 (0) [0.0-6.2]	19.0 (11) [10.9-30.9]	100.0 (58) [93.8-100]	24.1 (14) [15.0-36.5]	0.0 (0) [0.0-6.2]	0.0 (0) [0.0-6.2]
	Douala	86	9.3 (8) [4.8-17.3]	25.6 (22) [17.5-35.7]	87.2 (75) [78.5-92.7]	0.0 (0) [0.0-4.3]	12.8 (11) [7.3-21.5]	10.5 (9) [5.6-18.7]
Cameroon	Garoua	104	13.5 (14) [8.2-21.3]	57.7 (60) [48.1-66.7]	51.0 (53) [41.5-60.4]	1.0 (1) [0.2-5.2]	10.6 (11) [6.0-18.0]	18.3 (19) [12.0-26.8]
	Maroua	140	54.3 (76) [46.0-62.3]	73.6 (103) [65.7-80.2]	78.6 (110) [71.1-84.6]	0.0 (0) [0.0-2.7]	49.3 (69) [41.1-57.5]	52.9 (74) [44.6-60.9]
	Tibati	99	11.1 (11) [6.3-18.8]	57.6 (57) [47.7-66.8]	62.6 (62) [52.8-71.5]	0.0 (0) [0.0-3.7]	5.1 (5) [2.2-11.3]	7.1 (7) [3.5-13.9]
	Yaoundé	77	11.7 (9) [6.3-20.7]	41.6 (32) [31.2-52.7]	83.1 (64) [73.2-89.9]	0.0 (0) [0.0-4.8]	6.5 (5) [2.8-14.3]	9.1 (7) [4.5-17.6]
	Bangui	157	1.3 (2) [0.4-4.5]	59.9 (94) [52.1-67.2]	49.7 (78) [42.0-57.4]	9.6 (15) [5.9-15.2]	3.2 (5) [1.4-7.2]	1.9 (3) [0.7-5.5]
Congo	Brazzaville	23	8.7 (2) [2.4-26.8]	17.4 (4) [7.0-37.1]	95.7 (22) [79.0-99.2]	8.7 (2) [2.4-26.8]	17.4 (4) [7.0-37.1]	8.7 (2) [2.4-26.8]
	Kabare	74	0.0 (0) [0.0-4.9]	2.7 (2) [0.7-9.3]	94.6 (70) [86.9-97.9]	94.6 (70) [86.9-97.9]	54.1 (40) [42.8-64.9]	0.0 (0) [0.0-4.9]
Democratic Republic of Congo	Karawa	58	0.0 (0) [0.0-6.2]	55.2 (32) [42.5-67.3]	46.6 (27) [34.3-59.2]	19.0 (11) [10.9-30.9]	13.8 (8) [7.2-24.9]	0.0 (0) [0.0-6.2]
	Kinshasa	84	2.4 (2) [0.7-8.3]	6.0 (5) [2.6-13.2]	92.9 (78) [85.3-96.7]	22.6 (19) [15.0-32.6]	8.3 (7) [4.1-16.2]	2.4 (2) [0.7-8.3]
	Kisangani	81	0.0 (0) [0.0-4.5]	9.9 (8) [5.1-18.3]	90.1 (73) [81.7-94.9]	58.0 (47) [47.2-68.2]	25.9 (21) [17.6-36.4]	0.0 (0) [0.0-4.5]
	Mbandaka	59	0.0 (0) [0.0-6.1]	1.7 (1) [0.3-9.0]	98.3 (58) [91.0-99.7]	39.0 (23) [27.6-51.7]	32.2 (19) [21.7-44.9]	0.0 (0) [0.0-6.1]
	Pangi	58	0.0 (0) [0.0-6.2]	5.2 (3) [1.8-14.1]	93.1 (54) [83.6-97.3]	82.8 (48) [71.1-90.4]	44.8 (26) [32.7-57.5]	0.0 (0) [0.0-6.2]
Gabon	Franceville	23	4.3 (1) [0.8-21.0]	17.4 (4) [7.0-37.1]	95.7 (22) [79.0-99.2]	0.0 (0) [0.0-14.3]	0.0 (0) [0.0-14.3]	0.0 (0) [0.0-14.3]
	Libreville	57	0.0 (0) [0.0-6.3]	7.0 (4) [2.8-16.7]	94.7 (54) [85.6-98.2]	3.5 (2) [1.0-11.9]	0.0 (0) [0.0-6.3]	0.0 (0) [0.0-6.3]
	Oyem	84	4.8 (4) [1.9-11.6]	15.5 (13) [9.3-24.7]	88.1 (74) [79.5-93.4]	15.5 (13) [9.3-24.7]	2.4 (2) [0.7-8.3]	2.4 (2) [0.7-8.3]
Nigeria	Port Harcourt	57	28.1 (16) [18.1-40.8]	47.4 (27) [35.0-60.1]	89.5 (51) [78.9-95.1]	0.0 (0) [0.0-6.3]	24.6 (14) [15.2-37.1]	29.8 (17) [19.5-42.7]

Ninety-five percent confidence intervals (CIs) of proportions were calculated using Wilson score method without continuity correction.

**Supplementary Table 4: Prevalence of *pfdhps* allele depending on *pfdhfr* allele at all study sites**

<i>pfdhps</i> allele	<i>pfdhfr</i> allele, % (n)					
	CNCSI	CNCnI	CNrnI	CiCnI	CirnI	Cirnl
<b>ISAKAA</b>	13.2 (5)	2.6 (1)	7.9 (3)	10.5 (4)	65.8 (25)	0 (0)
<b>IaAKAA</b>	1.9 (4)	1.0 (2)	4.8 (10)	8.7 (18)	83.7 (174)	0 (0)
<b>ISgKAA</b>	1.2 (6)	0.6 (3)	1.4 (7)	5.8 (29)	91.0 (455)	0 (0)
<b>IagKAA</b>	1.6 (1)	0 (0)	1.6 (1)	6.5 (4)	90.3 (56)	0 (0)
<b>IagKAs</b>	0 (0)	0 (0)	18.2 (2)	0 (0)	81.8 (9)	0 (0)
<b>ISgeAA</b>	0 (0)	0 (0)	0.8 (1)	17.3 (23)	81.2 (108)	0.8 (1)
<b>ISgegA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15.8 (18)	84.2 (96)	0 (0)
<b>ISAegA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
<b>vagKAA</b>	0 (0)	0 (0)	14.3 (3)	0 (0)	85.7 (18)	0 (0)
<b>vagKAs</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100.0 (4)	0 (0)
<b>vagKgs</b>	0 (0)	0 (0)	4.3 (4)	2.1 (2)	93.6 (88)	0 (0)
<b>IaAKgA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
<b>IcAKAA</b>	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>IfAKAs</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (3)	0 (0)
<b>ISgKgA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
<b>ISgKgA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
<b>ISgKgs</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)

*Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581 and 613. *Pfdhfr* alleles are named according to the amino acid present at positions 50, 51, 59, 108 and 164. The wild- type amino acid is stated in upper case, with the mutated amino acid in lowercase.

**Supplementary Table 5: Number of samples harbouring the *pfdhps* I431V mutation for each site and country from MalariaGEN data**

Country	Site	Period	I431V % (n/N)	Alleles harbouring I431V mutation
<b>Bangladesh</b>	Bandarban	2008 – 2009	0 (0/36)	-
	Ramu	2012	0 (0/51)	-
<b>Benin</b>	Cotonou	2014	20.2 (18/89)	18 vagKgs
<b>Burkina Faso</b>	Bobo-Dioulasso	2008	0 (0/57)	-
	Pailin	2007 – 2012	0 (0/151)	-
<b>Cambodia</b>	Preah Vihear	2011 – 2015	0 (0/182)	-
	Pursat	2007; 2009 – 2015	0 (0/517)	-
	Ratanakiri	2010 – 2014	0 (0/225)	-
	Tasanh	2008 – 2009	0 (0/61)	-
<b>Cameroon</b>	Buea	2013	34.2 (81/237)	49 vagKgs 25 vagKAA 4 vagKAs 1 vaAKAA 1 vaAKAs 1 vaAKgs
	Buenaventura	2011	0 (0/3)	-
<b>Colombia</b>	Guapi	2011	0 (0/4)	-
	Quibdo	2011	0 (0/3)	-
	Tumaco	2011	0 (0/6)	-
<b>Congo DR</b>	Kinshasa	2012 – 2015	0 (0/366)	-
<b>Ethiopia</b>	Shewa Robit Town Health Centre	2015	0 (0/11)	-
	West Arsi Zone	2013	0 (0/14)	-
<b>Gambia</b>	Basse	2013 – 2014	0 (0/111)	-
	Brikama	2008; 2014 – 2015	0 (0/122)	-
	Madina Samako	2014	0 (0/1)	-
	Njaiyel	2014	0 (0/3)	-
<b>Ghana</b>	Cape-Coast	2014	1.0 (1/101)	1 vagKgs
	Ghana returning traveller	2009	0 (0/3)	-
	Kintampo	2011 – 2013	1.8 (1/56)	1 vagKgs
	Navrongo	2009 – 2013; 2015	0.2 (2/821)	2 vagKgs
<b>Guinea</b>	Faranah	2011	0 (0/49)	-
	Nzerekore	2011	0.8 (1/120)	1 vagKAA
<b>Indonesia</b>	Timika	2010 – 2014	0 (0/88)	-
<b>Ivory Coast</b>	Abobo	2013 – 2014	12.9 (4/31)	3 vagKgs 1 vaAKAA
	Koumassi	2013 – 2014	0 (0/19)	-
	Yopougon	2013 – 2014	0 (0/20)	-
<b>Kenya</b>	Kenya returning traveller	2009	0 (0/2)	-
	Kilifi	2007	0 (0/62)	-
	Kisumu	2014	0 (0/34)	-
	Kombewa	2014	0 (0/27)	-
<b>Laos</b>	Attapeu	2011 – 2012	0 (0/85)	-
	Xepon	2010	0 (0/40)	-
<b>Madagascar</b>	Antsohihy	2014	0 (0/5)	-
	Farafangana	2014	0 (0/1)	-
	Maevatanana	2012 – 2013	0 (0/18)	-
<b>Malawi</b>	Chikwawa	2011	0 (0/297)	-
	Zomba	2011	0 (0/51)	-
<b>Mali</b>	Bamako	2012 – 2013	0.6 (1/162)	1 vagKgs
	Bandiagara	2007	0 (0/9)	-
	Faladje	2007; 2013 – 2014	0.6 (1/171)	1 vaAKAA
	Kolle	2007	0 (0/51)	-
<b>Mauritania</b>	Nioro du Sahel	2013 – 2014	0 (0/52)	-
	Aioun	2014	0 (0/9)	-
	Kobeni	2014	0 (0/22)	-
	Nema	2014	0 (0/28)	-
	Selibaby	2014	0 (0/21)	-

<b>Mozambique</b>	Mozambique returning traveller	2009	0 (0/1)	-
<b>Myanmar</b>	Bago	2011 – 2013	0 (0/94)	-
	Kawthaung	2011	0 (0/50)	-
	Myitkyina	2013 – 2014	0 (0/27)	-
	Pyin Oo Lwin	2012 – 2014	0 (0/23)	-
	Thabeikkyin	2013 – 2014	0 (0/54)	-
<b>Nigeria</b>	Bagdary	2014	3.7 (1/27)	1 vagKgs
	Ilorin	2011 – 2012	25.0 (2/8)	2 vagKAs
<b>Papua New Guinea</b>	East Sepik	2009; 2012 – 2013	0 (0/52)	-
	Madang	2007 – 2010	0 (0/52)	-
	Milne Bay	2013	0 (0/29)	-
<b>Peru</b>	Iquitos, Loreto Province	2011	0 (0/11)	-
	Loreto	2009; 2015	0 (0/12)	-
<b>Senegal</b>	Pikine	2013 – 2014	0 (0/85)	-
<b>Tanzania</b>	Mkuzi-Muheza	2013	0 (0/154)	-
	Morogoro	2010	0 (0/34)	-
	Muheza	2010	0 (0/16)	-
	Muleba	2013	0 (0/55)	-
	Nachingwea	2013	0 (0/69)	-
<b>Thailand</b>	Mae Sot	2001 – 2013	0 (0/903)	-
	Ranong	2011 – 2012	0 (0/27)	-
	Sisakhet	2011 – 2013	0 (0/28)	-
<b>Uganda</b>	Apac	2010	0 (0/13)	-
	Uganda returning traveller	2009	0 (0/2)	-
<b>Viet Nam</b>	Binh Phuoc	2009 – 2012	0 (0/123)	-
	Phuoc Long	2010 – 2011	0 (0/126)	-

*Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581 and 613.

**Supplementary Table 6: Extensive review of the literature searching for studies investigating the *pf dhps* I431V mutation**

Study	Period	Country	Successful sequencing	I431V (%)	Allele
Novel <i>pf dhps</i> Haplotypes among Imported Cases of <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria in the United Kingdom	ND	Nigeria	15	6 (40.0)	4 vagKgs 2 vagKAA
Prevalence of <i>Plasmodium falciparum</i> parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant <i>pf dhfr/pf dhps</i> alleles	2010 - 2011	Cameroon	100	13 (13.0)	8 vagKAA 3 vagKgs 1 vagKAs 1 vaAKAA
Prevalence of <i>Plasmodium falciparum</i> parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in the Democratic Republic of the Congo: emergence of highly resistant <i>pf dhfr/pf dhps</i> alleles	2014 - 2015	Democratic Republic of the Congo	1,435	10 (0.7)	9 vagKgs 1 vSgKgA 1 vSgegs*
Widespread resistance mutations to sulfadoxine-pyrimethamine in malaria parasites imported to China from Central and Western Africa	2016 - 2018	Ghana	135	1 (0.7)	1 vagKgs
High multiple mutations of <i>Plasmodium falciparum</i> -resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos, Nigeria	2010 - 2011, and 2013 - 2014	Nigeria	167	42 (25.2)	33 vagKgs 4 vagKgA 3 vagKAs 1 vagKAA 1 vSgKAA
Low prevalence of highly sulfadoxine-resistant dihydropteroate synthase alleles in <i>Plasmodium falciparum</i> isolates in Benin	2017	Benin	153	4 (2.6)	3 vagKgs 1 vagKAs
High Frequency Mutations in <i>pf dhfr</i> and <i>pf dhps</i> of <i>Plasmodium falciparum</i> in Response to Sulfadoxine-Pyrimethamine: A Cross-Sectional Survey in Returning Chinese Migrants From Africa	2017 - 2019	Nigeria	22	8 (36.4)	6 vaAKgA 1 vaAKgs 1 vaAKAA
		Chad	1	1 (100)	1 vSgKgA
		Equatorial Guinea	6	1 (16.7)	1 vaAKgA
		Cameroon	14	2 (14.3)	1 vaAKAA 1 vaAKgA
Prevalence of Mutations in the <i>Pf dhfr</i> , <i>Pf dhps</i> , and <i>Pf ndr1</i> Genes of Malarial Parasites Isolated from Symptomatic Patients in Dogondoutchi, Niger	2017	Niger	155	1 (0.7)	1 ND
Molecular Epidemiology of Drug Resistance Genes in <i>Plasmodium falciparum</i> Isolates Imported from Nigeria between 2016 and 2020: Continued Emergence of Fully Resistant <i>Pf dhfr-Pf dhps</i> Alleles	2016 - 2020	Nigeria	152	33 (21.7)	23 vagKgs 2 vSgKAA 2 vagKAA 2 vSgKgA 2 vagKAs 1 vSgKAs 1 vagKgA
Molecular Determinants of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in <i>Plasmodium falciparum</i> Isolates from Central Africa between 2016 and 2021: Wide Geographic Spread of Highly Mutated <i>Pf dhfr</i> and <i>Pf dhps</i> Alleles	2016 - 2020	Angola	47	1 (2.1)	1 vagKgs
		Cameroon	59	5 (8.5)	3 vagKAA 2 vagKgs
		Democratic Republic of the Congo	44	4 (9.1)	4 vagKgs
		Equatorial Guinea	37	4 (10.8)	1 vSgKAA 1 vagKAA 1 vSgKgs 1 vagKgs
		Gabon	15	1 (6.7)	1 vagKgs
		Congo	12	1 (8.3)	1 vagKgs
		Chad	10	2 (20.0)	2 vagKgs
		Nigeria	146	82 (56.2)	61 vagKgs 21 ND
Distinct pattern and prevalence of <i>Plasmodium falciparum</i> dihydropteroate synthase gene mutations in children with sickle cell anaemia and haemoglobin AA in Benin City, Nigeria: the impact of HbAA	ND	Nigeria	146	82 (56.2)	61 vagKgs 21 ND
Effect of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on	2020 - 2020	Cameroon	159	24 (15.1)	18 vagKgs 6 vagKAA

selection of the new <i>P. falciparum dhps</i> quintuple mutant carrying the I431V mutation					
A snapshot of the prevalence of dihydropteroate synthase-431V mutation and other sulfadoxine-pyrimethamine resistance markers in <i>Plasmodium falciparum</i> isolates in Nigeria	2020 - 2021	Nigeria	61	24 (39.3)	9 vagKgs 9 vagKAA 6 vagKAs
Molecular Markers of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in Samples from Children with Uncomplicated <i>Plasmodium falciparum</i> at Three Sites in Angola in 2019	2019	Angola	60	1 (1.7)	1 vagKgs
Surveillance of Antimalarial Drug-Resistance Genes in Imported <i>Plasmodium falciparum</i> Isolates From Nigeria in Henan, China, 2012-2019	2012 - 2019	Nigeria	159	43 (27.0)	27 vagKgs 8 vagKAA 2 vaAKAA 2 vagKgA 2 vagKAs 1 vSgKgA 1 vSgKgs
Prevalence of <i>Plasmodium falciparum</i> haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries: a genomic surveillance study	2018	Mali	310	1 (0.3)	1 vagKgs
		Niger	252	8 (3.2)	6 vagKgs 2 vagKAA
		Nigeria	249	12 (4.8)	5 vagKgs 3 vagKAA 2 vagKAs 1 vSgKAA 1 vSgKgs
		Chad	136	23 (16.9)	16 vagKgs 7 vagKAA

ND, not determined

*Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581 and 613.

\* It should be noted that the vSggs genotype was observed in one sample containing mixed alleles (codons 431, 540, 581 and 613), leading to the possibility that this genotype did not actually occur within a single genome in this sample.

**Supplementary Table 7: Microsatellite haplotypes ranked, first according to allele size at locus 0.8 kb and then by allele size at locus 4.3 kb.**

Microsatellite haplotype	0.8 kb	4.3 kb
1	79	104
2	102	104
3	104	104
4	104	106
5	104	108
6	108	104
7	108	106
8	108	110
9	110	104
10	110	108
11	112	104
12	112	106
13	112	108
14	112	110
15	114	100
16	114	102
17	114	104
18	114	106
19	116	100
20	116	102
21	116	104
22	116	106
23	116	108
24	116	110
25	118	102
26	118	104
27	118	106
28	118	108
29	118	110
30	120	102
31	120	104
32	120	106
33	120	108
34	120	110
35	122	100
36	122	104
37	122	106
38	122	108
39	122	112
40	124	98
41	124	104
42	124	106
43	124	108
44	124	110
45	126	104
46	126	106
47	126	108
48	128	104
49	130	104
50	130	106
51	130	108
52	130	110
53	132	104

**Supplementary Table 8: Expected heterozygosity (He) depending on *pfdhps* allele for all study sites.**

	<b>0,8 kb He (n)</b>	<b>4,3 kb He (n)</b>	<b>7,7 kb He (n)</b>
<b>ISAKAA</b>	0.937 (20)	0.560 (26)	0.909 (24)
<b>IaAKAA</b>	0.873 (70)	0.648 (85)	0.882 (85)
<b>ISgKAA</b>	0.625 (253)	0.594 (273)	0.890 (239)
<b>IagKAA</b>	0.370 (43)	0.417 (45)	0.886 (31)
<b>ISgeAA</b>	0.515 (91)	0.321 (98)	0.543 (96)
<b>ISgegA</b>	0.402 (102)	0.087 (112)	0.334 (108)
<b>vagKAA</b>	0.177 (22)	0.245 (23)	0.490 (18)
<b>vagKAs</b>	0.400 (5)	0.500 (4)	0.800 (5)
<b>vagKgs</b>	0.060 (99)	0.157 (97)	0.192 (98)

*Pfdhps* alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581 and 613.

**Supplementary Table 9: Accession ID of MalariaGEN samples included for the discriminant analysis of principal components (DAPC).**

Accession ID	Continent	Country	Accession ID	Continent	Country
FP0009-C	Africa	Mauritania	PT0027-C	Africa	Malawi
FP0015-C	Africa	Mauritania	PT0031-C	Africa	Malawi
FP0017-C	Africa	Mauritania	PT0035-C	Africa	Malawi
FP0018-C	Africa	Mauritania	PT0039-C	Africa	Malawi
FP0021-C	Africa	Mauritania	PT0041-C	Africa	Malawi
FP0022-C	Africa	Mauritania	PT0042-C	Africa	Malawi
FP0028-C	Africa	Mauritania	PT0055-C	Africa	Malawi
FP0029-C	Africa	Mauritania	PT0058-C	Africa	Malawi
FP0030-C	Africa	Mauritania	PT0170-C	Africa	Malawi
FP0032-C	Africa	Mauritania	PT0179-C	Africa	Malawi
PA0007-C	Africa	Gambia	PV0254-C	Asia	Viet Nam
PA0022-C	Africa	Gambia	PV0256-C	Asia	Viet Nam
PA0034-C	Africa	Gambia	PV0257-C	Asia	Viet Nam
PA0040-C	Africa	Gambia	PV0258-C	Asia	Viet Nam
PA0050-C	Africa	Gambia	PV0259-C	Asia	Viet Nam
PA0061-C	Africa	Gambia	PV0261-C	Asia	Viet Nam
PA0085-C	Africa	Gambia	PV0262-C	Asia	Viet Nam
PA0087-C	Africa	Gambia	PV0264-C	Asia	Viet Nam
PA0092-C	Africa	Gambia	PV0265-C	Asia	Viet Nam
PA0098-C	Africa	Gambia	PV0266-C	Asia	Viet Nam
PA0138-C	Africa	Guinea	PW0001-C	America	Colombia
PA0144-C	Africa	Guinea	PW0002-C	America	Colombia
PA0155-C	Africa	Guinea	PW0003-C	America	Colombia
PA0169-C	Africa	Guinea	PW0004-C	America	Colombia
PA0176-C	Africa	Guinea	PW0005-C	America	Colombia
PA0190-C	Africa	Guinea	PW0006-C	America	Colombia
PA0254-C	Africa	Guinea	PW0007-C	America	Colombia
PA0257-C	Africa	Guinea	PW0008-C	America	Colombia
PA0260-C	Africa	Guinea	PW0009-C	America	Colombia
PA0263-C	Africa	Guinea	PW0010-CW	America	Colombia
PC0178-C	Africa	Kenya	PZ0001-CW	Africa	Uganda
PC0180-C	Africa	Kenya	PZ0002-CW	Africa	Uganda
PC0188-C	Africa	Kenya	PZ0003-CW	Africa	Uganda
PC0191-C	Africa	Kenya	PZ0004-CW	Africa	Uganda
PC0193-C	Africa	Kenya	PZ0005-C	Africa	Uganda
PC0198-C	Africa	Kenya	PZ0006-CW	Africa	Uganda
PC0199-C	Africa	Kenya	PZ0007-C	Africa	Uganda
PC0201-C	Africa	Kenya	PZ0008-CW	Africa	Uganda
PC0202-C	Africa	Kenya	PZ0009-CW	Africa	Uganda
PC0236-C	Africa	Kenya	PZ0010-CW	Africa	Uganda
PD0461-C	Asia	Thailand	QC0170-C	Asia	Myanmar
PD0464-C	Asia	Thailand	QC0172-C	Asia	Myanmar
PD0491-C	Asia	Thailand	QC0173-C	Asia	Myanmar
PD0502-C	Asia	Thailand	QC0174-C	Asia	Myanmar
PD0521-C	Asia	Thailand	QC0175-C	Asia	Myanmar
PD0545-C	Asia	Thailand	QC0177-C	Asia	Myanmar
PD0550-C	Asia	Thailand	QC0180-C	Asia	Myanmar
PD0553-C	Asia	Thailand	QC0185-C	Asia	Myanmar
PD0555-C	Asia	Thailand	QC0188-C	Asia	Myanmar
PD0556-C	Asia	Thailand	QC0194-C	Asia	Myanmar
PE0090-C	Africa	Tanzania	QE0395-C	Asia	Laos
PE0091-C	Africa	Tanzania	QE0397-C	Asia	Laos
PE0105-C	Africa	Tanzania	QE0398-C	Asia	Laos
PE0109-C	Africa	Tanzania	QE0399-C	Asia	Laos
PE0113-C	Africa	Tanzania	QE0401-C	Asia	Laos
PE0117-C	Africa	Tanzania	QE0407-C	Asia	Laos
PE0160-C	Africa	Tanzania	QE0409-C	Asia	Laos
PE0162-C	Africa	Tanzania	QE0410-C	Asia	Laos
PE0177-C	Africa	Tanzania	QE0411-C	Asia	Laos
PE0180-C	Africa	Tanzania	QE0412-C	Asia	Laos
PF0004-C	Africa	Ghana	QG0185-C	Africa	Congo DR
PF0012-C	Africa	Ghana	QG0186-C	Africa	Congo DR
PF0074-C	Africa	Ghana	QG0188-C	Africa	Congo DR
PF0075-C	Africa	Ghana	QG0190-C	Africa	Congo DR
PF0079-C	Africa	Ghana	QG0192-C	Africa	Congo DR
PF0081-C	Africa	Ghana	QG0194-C	Africa	Congo DR
PF0085-C	Africa	Ghana	QG0195-C	Africa	Congo DR
PF0114-C	Africa	Ghana	QG0211-C	Africa	Congo DR

PF0138-C	Africa	Ghana	QG0255-C	Africa	Congo DR
PF0245-C	Africa	Ghana	QJ0001-C	Africa	Nigeria
PH0056-C	Asia	Cambodia	QJ0002-C	Africa	Nigeria
PH0210-C	Asia	Cambodia	QJ0003-C	Africa	Nigeria
PH0283-C	Asia	Cambodia	QJ0004-C	Africa	Nigeria
PH0306-C	Asia	Cambodia	QJ0005-C	Africa	Nigeria
PH0364-C	Asia	Cambodia	QJ0006-C	Africa	Nigeria
PH0371-C	Asia	Cambodia	QJ0007-C	Africa	Nigeria
PH0373-C	Asia	Cambodia	QJ0008-C	Africa	Nigeria
PH0375-C	Asia	Cambodia	QJ0009-C	Africa	Nigeria
PH0376-C	Asia	Cambodia	QJ0010-C	Africa	Nigeria
PH0480-C	Asia	Cambodia	QJ0015-C	Africa	Nigeria
PK0002-C	Africa	Burkina Faso	QM0005-C	Africa	Madagascar
PK0007-C	Africa	Burkina Faso	QM0006-C	Africa	Madagascar
PK0009-C	Africa	Burkina Faso	QM0008-C	Africa	Madagascar
PK0011-C	Africa	Burkina Faso	QM0027-C	Africa	Madagascar
PK0017-C	Africa	Burkina Faso	QM0030-C	Africa	Madagascar
PK0019-C	Africa	Burkina Faso	QM0036-C	Africa	Madagascar
PK0020-C	Africa	Burkina Faso	QM0038-C	Africa	Madagascar
PK0025-C	Africa	Burkina Faso	QM0041-C	Africa	Madagascar
PK0026-C	Africa	Burkina Faso	QM0056-C	Africa	Madagascar
PK0034-C	Africa	Burkina Faso	QM0057-C	Africa	Madagascar
PM0002-C	Africa	Mali	QP0001-C	Africa	Cameroon
PM0019-C	Africa	Mali	QP0002-C	Africa	Cameroon
PM0024-C	Africa	Mali	QP0003-C	Africa	Cameroon
PM0043-C	Africa	Mali	QP0004-C	Africa	Cameroon
PM0073-C	Africa	Mali	QP0005-C	Africa	Cameroon
PM0076-C	Africa	Mali	QP0006-C	Africa	Cameroon
PM0077-C	Africa	Mali	QP0008-C	Africa	Cameroon
PM0097-C	Africa	Mali	QP0009-C	Africa	Cameroon
PM0100-C	Africa	Mali	QP0010-C	Africa	Cameroon
PM0160-C	Africa	Mali	QP0011-C	Africa	Cameroon
PN0008-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0009-C	Africa	Ivory Coast
PN0031-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0013-C	Africa	Ivory Coast
PN0037-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0014-C	Africa	Ivory Coast
PN0055-Cx	Oceania	Papua New Guinea	QQ0033-C	Africa	Ivory Coast
PN0058-Cx	Oceania	Papua New Guinea	QQ0039-C	Africa	Ivory Coast
PN0063-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0049-C	Africa	Ivory Coast
PN0073-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0050-C	Africa	Ivory Coast
PN0077-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0051-C	Africa	Ivory Coast
PN0078-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0073-C	Africa	Ivory Coast
PN0086-C	Oceania	Papua New Guinea	QQ0096-C	Africa	Ivory Coast
PP0005-C	America	Peru	QS0104-C	Africa	Ethiopia
PP0010-C	America	Peru	QS0116-C	Africa	Ethiopia
PP0011-C	America	Peru	QS0129-C	Africa	Ethiopia
PP0012-C	America	Peru	QS0144-C	Africa	Ethiopia
PP0013-C	America	Peru	QS0154-C	Africa	Ethiopia
PP0014-C	America	Peru	QS0157-C	Africa	Ethiopia
PP0015-C	America	Peru	QS0159-C	Africa	Ethiopia
PP0016-C	America	Peru	QS0162-C	Africa	Ethiopia
PP0017-C	America	Peru	QS0169-C	Africa	Ethiopia
PP0019-C	America	Peru	QS0170-C	Africa	Ethiopia
PR0114-C	Asia	Bangladesh	QT0001-C	Africa	Benin
PR0133-C	Asia	Bangladesh	QT0002-C	Africa	Benin
PR0144-C	Asia	Bangladesh	QT0004-C	Africa	Benin
PR0151-C	Asia	Bangladesh	QT0005-C	Africa	Benin
PR0155-C	Asia	Bangladesh	QT0006-C	Africa	Benin
PR0158-C	Asia	Bangladesh	QT0008-C	Africa	Benin
PR0159-C	Asia	Bangladesh	QT0009-C	Africa	Benin
PR0162-C	Asia	Bangladesh	QT0012-CW2	Africa	Benin
PR0165-C	Asia	Bangladesh	QT0014-C	Africa	Benin
PR0166-C	Asia	Bangladesh	QT0015-CW2	Africa	Benin

**Supplementary Table 10: Number of nucleotide deletions/insertions for seven microsatellites around the *pfdhps* gene.**

Lineage <sup>1</sup>	Allele	Country	Malariagen ID	Clonality <sup>2</sup>	-7.5 kb	-2.9 kb	-1.5 kb	-0.13 kb	0.5 kb	1.4 kb	6.4 kb
GP1	vagKgs	Benin	QT0012-C	Mono	-2	-6	ND	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0012-CW	Mono	ND	-6	-6	ND	ND	ND	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0012-CW2	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0012-CW3	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0020-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0020-CW	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0020-CW2	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0031-CW2	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0033-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0033-CW	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0033-CW2	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Benin	QT0033-CW3	Mono	ND	-6	ND	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Cameroon	QP0012-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Cameroon	QP0224-C	Mono	ND	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Cameroon	QP0044-C	Poly	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Cameroon	QP0029-C	Poly	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Cameroon	QP0228-C	Mono	-2	-6	-6	-2	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Ghana	PF0290-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-4 and -6	-10	-20
GP1	vagKgs	Ghana	PF1026-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Ghana	PF0633-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Ivory Coast	QQ0048-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Ivory Coast	QQ0082-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Mali	PM0432-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP1	vagKgs	Nigeria	QJ0010-C	Mono	-2	-6	-6	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Benin	QT0005-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Benin	QT0005-CW	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Benin	QT0005-CW2	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Benin	QT0005-CW3	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0153-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0111-C	Poly	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0169-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0187-C	Poly	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0178-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0091-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0164-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0177-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0230-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0041-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0102-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0033-C	Poly	-2 and -4	-10 and -14	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0123-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
GP2	vagKgs	Cameroon	QP0217-C	Poly	-4	-10 and -14	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20

GP2	vagKgs	Cameroon	QP0233-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Benin	QT0004-C	Mono	-4	-6	ND	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Benin	QT0004-CW3	Mono	ND	-6	ND	-4	-6	ND	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0069-C	Poly	-4	-10	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0213-C	Poly	-4	-10	ND	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0204-C	Poly	-2	-6 and -10	-2 and -6	-4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0208-C	Poly	-4	-10 and -14	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0189-C	Poly	-2	-14	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0085-C	Poly	ND	-6 and -14	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0151-C	Poly	-4	-10	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0201-C	Poly	-2	-10	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0193-C	Poly	-4	-10 and -14	-2	-4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0225-C	Poly	-2	-6 and -14	-2	-4	-4 and -6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0232-C	Poly	-2 and -4	-6 and -14	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-16 and -20
core	vagKgs	Cameroon	QP0182-C	Poly	-2 and -4	-10	-2 and -6	-4	-6	-10	-12 and -16
core	vagKgs	Cameroon	QP0036-C	Mono	-2	-14	-6	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0242-C	Poly	-4	-10	-6	-4	-4 and -6	-10 and -18	-16 and -20
core	vagKgs	Cameroon	QP0054-C	Poly	-4	-10 and -14	-2 and -6	-4	-4 and -6	-10 and -18	-16 and -20
core	vagKgs	Cameroon	QP0037-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0121-C	Poly	-2 and +2	-6 and -8	-6	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0021-C	Poly	-4	-10 and -14	-2 and -6	-4	-4 and -6	-10	-16 and -20
core	vagKgs	Cameroon	QP0181-C	Poly	-4	-10 and -14	-2	-4	-6 and -8	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0092-C	Poly	-4	-10	ND	-4	-6 and -8	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0202-C	Poly	-2 and -4	-6 and -14	-6	-2 and -4	-8	-10	-8 and -12
core	vagKgs	Cameroon	QP0211-C	Poly	ND	-2 and -12	-2	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0127-C	Mono	ND	-6	-6	-4	-6	-10	-12
core	vagKgs	Cameroon	QP0158-C	Mono	-2	-6 and -10	-2 and -6	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0241-C	Poly	-2 and -4	-14	-6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-8 and -20
core	vagKgs	Cameroon	QP0103-C	Mono	-4	-10	-2	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Cameroon	QP0072-C	Poly	-2 and -4	-10 and -14	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-16
core	vagKgs	Cameroon	QP0179-C	Poly	-4	-10 and -14	-2 and -6	-2 and -4	-6 and -8	-10	-12
core	vagKgs	Cameroon	QP0017-C	Poly	-2 and -4	ND	-2 and -6	-2 and -4	-4 and -6	-10	-8
core	vagKgs	Ghana	PF0778-C	Mono	-4	-6	-6	-4	-6	-10	-20
core	vagKgs	Ivory Coast	QQ0083-C	Poly	-2	-6 and -8	-2 and -6	-4	-6	-10	-16 and -20
-	vagKAA	Cameroon	QP0057-C	Mono	-4	-6	-6	-4	-8	-12	-16
-	vagKAA	Cameroon	QP0125-C	Mono	-4	-6	-6	-4	-8	-10	-16
-	vagKAA	Cameroon	QP0080-C	Mono	-4	-6	-6	-4	-8	-12	-16
-	vagKAA	Cameroon	QP0093-C	Mono	-4	-6	-6	-4	-8	-12	-16
-	vagKAA	Cameroon	QP0055-C	Mono	-4	-6	ND	-4	-8	-12	-16
-	ISgKAA	Cameroon	QP0014-C	Mono	ND	-14	-6	-2	-8	ND	-20
-	ISgKAA	Cameroon	QP0026-C	Mono	ND	ND	-6	-2	-4	-10	-8
-	ISgKAA	Cameroon	QP0032-C	Mono	ND	-14	-6	-2	-4	-10	-16
-	ISgKAA	Cameroon	QP0034-C	Mono	ND	ND	-6	-4	-8	ND	-8
-	ISgKAA	Cameroon	QP0019-C	Mono	ND	-14	ND	-2	-4	-10	-16
-	ISgKAA	Ghana	PF0298-C	Mono	ND	-2	-2	-4	-4	-10	ND
-	ISgKAA	Ghana	PF0326-C	Mono	ND	ND	-6	-2	-6	ND	-10

-	ISgKAA	Ghana	PF0304-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-6	-4	-12
-	ISgKAA	Ghana	PF0309-C	Mono	-2	-2	-6	-2	-6	-4	-10
-	ISgKAA	Ghana	PF0299-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0310-C	Mono	ND	-12	-2	-2	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0301-C	Mono	-2	-2	-6	-2	-6	-4 and -6	-2 and -6
-	IagKAA	Ghana	PF0666-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-6	-4 and -6	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0625-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-4 and -6	ND	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0655-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-6	ND	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0638-C	Mono	-4	-4 and -2	-6	-2	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0661-C	Mono	-4	-2	-6	ND	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0632-C	Mono	ND	ND	-4	ND	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0689-C	Mono	-4	ND	-6	-2	-6	-4	-12
-	IagKAA	Ghana	PF0685-C	Mono	-4	-2	-6	-2	-6	-4	-12
-	IaAKAA	Cameroon	QP0038-C	Mono	-4	-14	-6	-4	-6	ND	-16
-	IaAKAA	Cameroon	QP0101-C	Mono	+5	ND	-4	-2	-8	ND	-12
-	IaAKAA	Cameroon	QP0068-C	Mono	ND	ND	ND	-4	-6	ND	-16
-	IaAKAA	Cameroon	QP0118-C	Mono	ND	ND	-4	-2	-8	-10	-12
-	IaAKAA	Ghana	PF0314-C	Mono	ND	-6	-6	-4	-4	ND	-12
-	IaAKAA	Ghana	PF0670-C	Mono	ND	ND	-6	-4	-8	ND	-12
-	IaAKAA	Ghana	PF0789-C	Mono	ND	ND	-10	-4	-8	ND	-8
-	IaAKAA	Ghana	PF1044-C	Mono	ND	-4	ND	-4	-4	ND	-10

ND, not determined; multiples values indicate different profiles for a single microsatellite. A value with the symbol “-” suggests a deletion; a value with the symbol “+” suggests an insertion.

<sup>1</sup> GP1 and GP2 are the vagKgs lineages we evidenced by PCA. The “core” group corresponds to non GP1, non GP2 vagKgs samples that are located in the core distribution on the PCA (Figure 4C).

<sup>2</sup> Clonality is based on the  $F_{ws}$  metric using the moimix R package. Samples with  $F_{ws} < 0.95$  were considered polyclonal.

**Supplementary Table 11: GWAS analysis based on the presence or absence of *vagKgs* allele focusing on the non-synonymous SNPs across 11 genes in the 50kb region of the 5' end of *pfdhps***

Gene ID	Name	Position	Non-synonymous mutation	Whole GWAS				
				non- <i>vagKgs</i> _wt <sup>1</sup>	non- <i>vagKgs</i> _mut	<i>vagKgs</i> _wt <sup>1</sup>	<i>vagKgs</i> _mut	log10(pval)
PF3D7_0809800	Conserved <i>Plasmodium</i> protein unknown function	503596	Y1035N	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0809800		503607	K1031I	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809800		503608	K1031E	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0809800		504319	N794Y	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0809800		505277	M474I	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0809800		505331	E456D	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809800		505342	K453Q	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809800		505345	K452Q	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809800		505493	E402D	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0809900		JmjC domain-containing protein 1	509976	T818S	447	37	61	31
PF3D7_0809900	510036		E798G	477	7	62	30	-19.2252
PF3D7_0809900	510607		D608Y	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809900	510993		N479S	468	16	75	17	-6.0071
PF3D7_0809900	511172		E419D	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0809900	511581		R283H	464	20	74	18	-5.651
PF3D7_0810200	ABC1 family		522282	H366Y	466	18	75	17
PF3D7_0810200		522327	R381G	467	17	75	17	-5.7661
PF3D7_0810200		522328	R381H	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0810200		522966	N594Y	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0810300	Protein phosphatase PPM5	525973	K341R	469	15	74	18	-6.863
PF3D7_0810600		542001	M11V	466	18	75	17	-5.5374

PF3D7_0810600		542477	Q169H	433	51	30	62	-28.7144
PF3D7_0810600		542479	G170V	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0810600	ATP-dependent RNA helicase DBP1	542685	I239F	463	21	72	20	-6.5439
PF3D7_0810600		544223	E751D	468	16	75	17	-6.0071
PF3D7_0810600		544231	K754R	468	16	75	17	-6.0071
PF3D7_0810600		544632	P888T	466	18	75	17	-5.5374
PF3D7_0810700	Conserved <i>Plasmodium</i> protein, unknown function	546841	K68N	256	228	92	0	-22.3213
PF3D7_0810800		549666	I431V	469	15	27	65	-48.2705
PF3D7_0810800	<i>Pfdhps</i>	549681	S436A	309	175	22	70	-11.695
PF3D7_0810800		550117	A581G	481	3	27	65	-59.1091
PF3D7_0810800		550212	A613S	457	27	26	66	-42.3462

<sup>1</sup>In order to improve the stringency of the GWAS analysis, heterozygous SNPs were considered as wild-type contrarily to the analysis pipeline used to define the dataset. Thus, *pfdhps* SNPs of *vagKgs* samples in the GWAS analysis could be considered as wild-type in mixed samples.

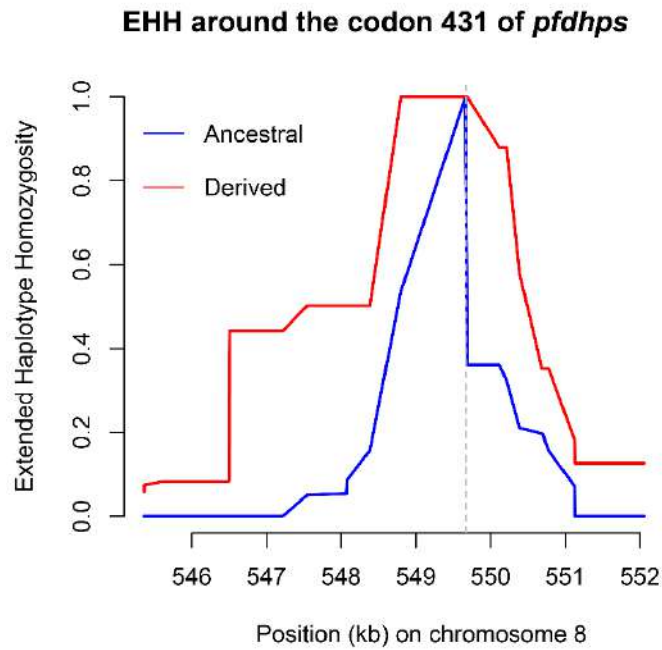
This table reports the details of the GWAS data restricted to the 11 genes upstream of *pfdhps* (50kb), the non-synonymous mutations, and SNPs with a  $-\log(p\text{-value}) < -5.5$ . The  $-\log(p\text{-value})$  for the SNP association, calculated using Fisher's exact test, was used to identify significant SNP differences between parasite lines carrying ( $n = 92$ ) or not ( $n = 484$ ) the *pfdhps* *vagKgs* allele.

The lines highlighted in green correspond to SNPs with a  $-\log(p\text{-value})$  value  $< -15$ . As expected, A581G, I431V and A613S SNPs had the highest  $-\log(p\text{-value})$ . The non-related *vagKgs* S436A mutation had a lower level of significance. The mutation A437G was not highlighted since its prevalence is very high across Africa. Three other codons were identified outside the *pfdhps* gene: the Q169H mutation of the ATP-dependent RNA helicase DBP1 and the E789G mutation in the JmjC domain-containing protein 1 whose functions are not well known in *P. falciparum* (Reddy et al. BMC Genomics (2015)) (<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.01.002>), and the 68N codon located in a conserved *Plasmodium* protein with unknown function which was always found as wild-type in the *vagKgs* group. These different SNPs were widely found in *P. falciparum* isolates from different continents (MalariaGEN data base, data not shown), suggesting that they are not involved in the selection phenomena.



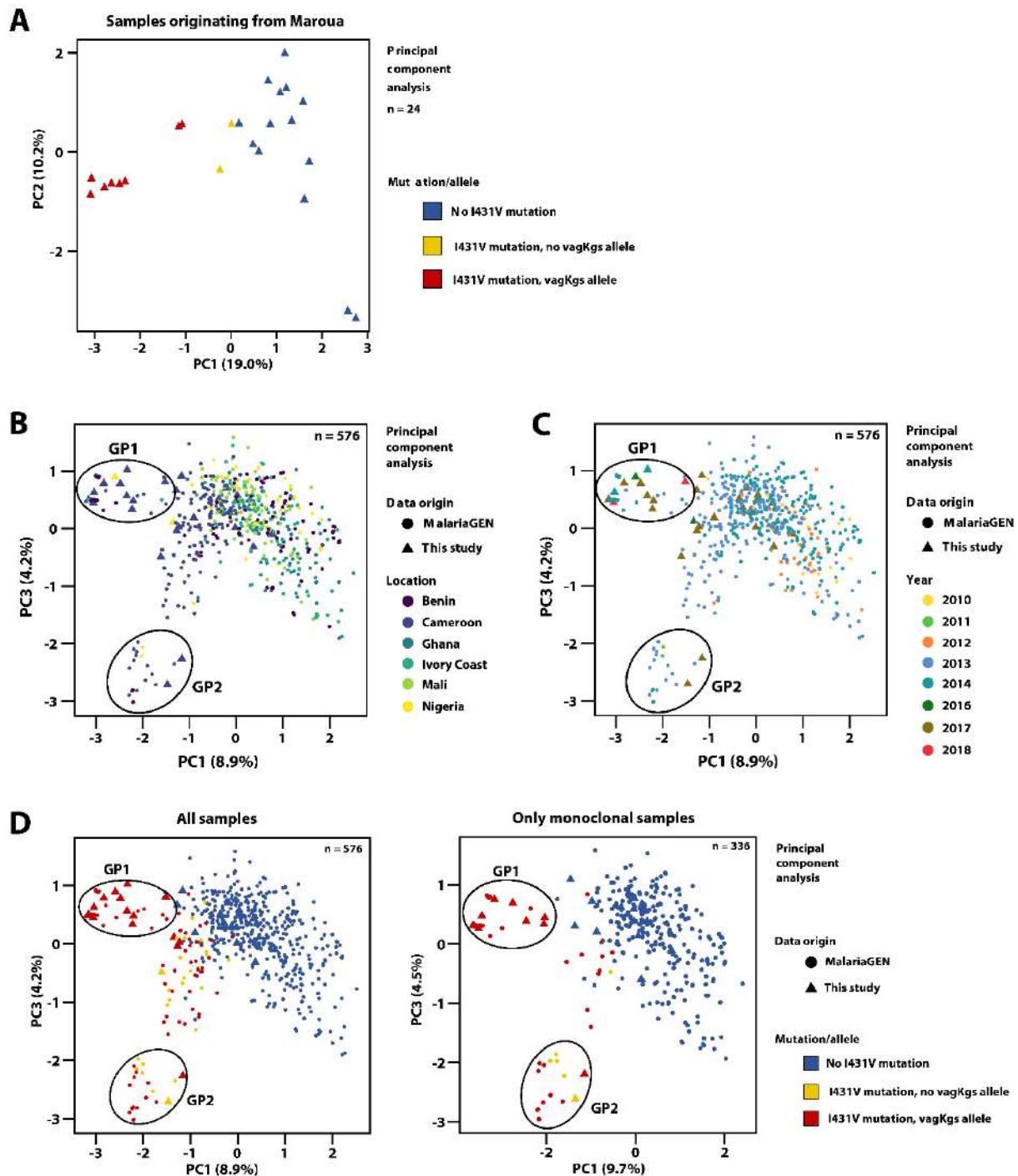
**Supplementary Figure 1: Eighteen study sites covering six Central African countries and one neighbouring country.**

The samples were collected in 2014 (Douala, Garoua), 2015 (Tibati, Yaoundé), 2016 (Libreville, Port-Harcourt), 2017 (Balombo, Brazzaville, Franceville, Maroua, Oyem), and 2018 (Bangui, Kabare, Karawa, Kinshasa, Kisangani, Mbandaka and Pangi). All sites corresponded to one health-care facility except for Maroua which corresponded to four sites within a 50 km radius.



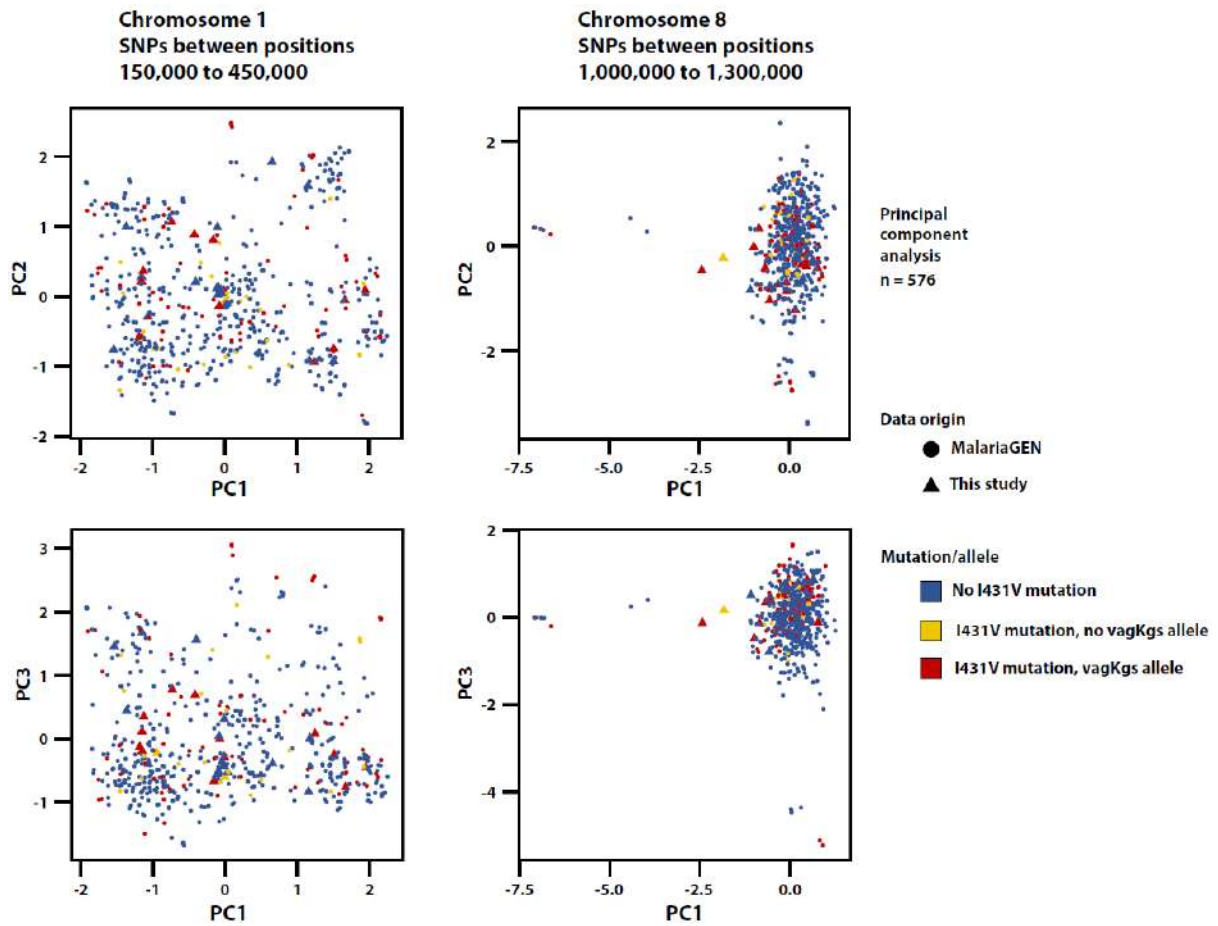
**Supplementary Figure 2: Extended haplotype homozygosity around the codon 431 of the *pfdhps* gene on chromosome 8.**

The EHH plot shows the decay of haplotype homozygosity with increasing distance from the core SNP represented here as the derived and ancestral alleles at codon 431 in the *pfdhps* gene. The x axis is the chromosome position of SNPs spanning chromosome 8 and the y axis is the probability of homozygosity at all SNPs for the entire interval from the core region to distance x. EHH = 0 means all extended haplotypes are different, while EHH = 1 indicates that all extended haplotypes are the same. In our plot, the red line represents the decay of homozygosity of the I431V mutation (derived), while the blue line signifies the decay of homozygosity of the wild-type I431 codon (ancestral).



**Supplementary Figure 3: Population structure of different *pfdhps* alleles based on a principal component analysis, according to (A) Maroua site, (B) country, (C) year of collection, or (D) multiplicity of infection.**

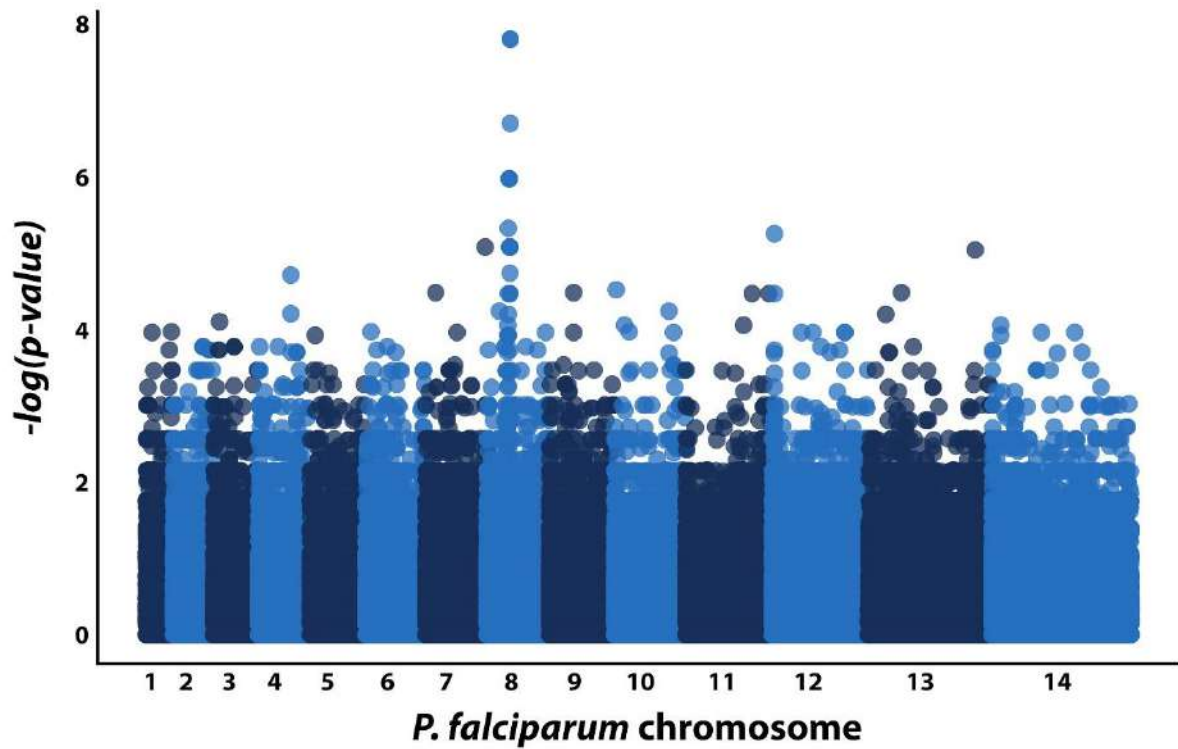
(A) A PCA performed on samples collected in the Maroua site with the highest prevalence of the *pfdhps* *vagKgs* allele showed a clear differentiation between *vagKgs* and non-*vagKgs* carrying samples. The dataset included 8 *vagKgs* samples, 2 samples harbouring the I431V mutation but not the *vagKgs* allele, and 14 samples with no I431V mutation. (B), (C), and (D) A total of 576 samples were included (89 from Benin, 180 from Cameroon, 100 from Ghana, 70 from Ivory Coast, 100 from Mali and 37 from Nigeria) covering 12,667 SNPs located in a range of +/-50 kb of *pfdhps*. In total, 92 samples carried the *pfdhps* *vagKgs* allele and 113 had the I431V mutation. Samples from this study are indicated as triangles while those from MalariaGEN are shown as circles. GP1 and GP2 include the same countries. Among the 576 samples, 336 were monoclonal according to the *F<sub>ws</sub>* statistic.



**Supplementary Figure 4: Population structure of different *pfdhps* alleles based on a principal component analysis from different chromosomal regions.**

A total of 576 samples were included (89 from Benin, 180 from Cameroon, 100 from Ghana, 70 from Ivory Coast, 100 from Mali and 37 from Nigeria). In total, 92 samples carried the *pfdhps* *vagKgs* allele and 113 had the I431V mutation. Samples from this study are indicated as triangles while those from MalariaGEN are shown as circles. The *left* plots (PC1 vs. PC2 and PC1 vs. PC3) show the distribution of samples based on 20,317 SNPs located between positions 150,000 and 450,000 of chromosome 1; the *right* plots (PC1 vs. PC2 and PC1 vs. PC3) indicate the distribution of samples based on 21,010 SNPs located between positions 1,000,000 and 1,300,000 of chromosome 8 (450,000 positions apart from the *pfdhps* gene).





**Supplementary Figure 6: Manhattan plot showing the significance of SNP association in the GWAS comparing GP1 and GP2 isolates.**

Each point represents 1 of the 2,217,669 SNPs in a set of 40 samples ( $n = 19$  for GP1,  $n = 21$  for GP2), coloured according to chromosome. The x-axis represents genomic location and the y-axis corresponds to the  $-\log(p\text{-value})$  for the SNP association calculated using Fisher's exact test.

### 3. Discussion

Ce travail a permis de réaliser une cartographie des différentes mutations de la *PfDHPS* et leur fréquence, en particulier la mutation Ile431Val, entre 2014 et 2018. Cette mutation, présente exclusivement en Afrique de l'Ouest et Centrale, est distribuée de manière très hétérogène à travers les différents sites de l'étude. Elle est très répandue au Bénin, au Nigéria, au Tchad et au Cameroun, notamment à Maroua, au nord du Cameroun.

Cette étude a confirmé que l'allèle le plus fréquemment retrouvé en présence de la mutation Ile431Val est, actuellement, le quintuple mutant **vagKgs**. Les allèles **vagKAA** et **vagKAs** sont moins fréquents. Contrairement à ce qui est observé pour les allèles **ISgeAA** et **ISgegA**, les allèles mutants **vagKAA** et **vagKgs** ne partagent pas le même haplotype de microsatellites, suggérant une lignée ancestrale différente. Cependant, une étude récente a montré une forte association entre une mutation non codante, a548383t, située dans le premier intron de *Pfdhps* et la mutation Ile431Val. Cette association était forte pour l'allèle **vagKgs**, plus faible pour **vagKAA**, suggérant que le quintuple mutant **vagKgs** pourrait être issu de l'allèle **vagKAA** qui portait la mutation intronique (297).

De façon intéressante, les mutations Ile431Val et Lys540Glu de la *PfDHPS* n'ont jamais été retrouvées associées. Elles présentent une cartographie inverse, avec une fréquence de la mutation Lys540Glu élevée en Afrique de l'Est, alors que la mutation Ile431Val est retrouvée en Afrique Centrale et de l'Ouest. La mutation Ile431Val pourrait être le marqueur de haute résistance à la sulfadoxine en Afrique de l'Ouest et Centrale.

Ce travail a mis en évidence l'origine africaine de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS*. L'émergence unique et récente de l'allèle **vagKgs**, l'absence de mutations compensatoires de type mutation ponctuelle ou variation du nombre de copies, et l'absence d'un fond génétique distinct, sont des arguments forts en faveur d'une sélection de cet allèle. A ce stade, l'hypothèse la plus probable, est la sélection de cet allèle quintuple mutant par la sulfadoxine, un inhibiteur de la *PfDHPS*.

### 4. Perspectives

#### 4.1. Historique de la mutation Ile431Val

L'évaluation historique de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS* se poursuit. L'étude rétrospective de la banque d'ADN de *P. falciparum* du Centre National de Référence (CNR) du

paludisme est en cours. Les échantillons issus de patients impaludés diagnostiqués en France, en provenance du Nigéria, Bénin, Cameroun et Tchad, de 1997 à 2022 ont été sélectionnés. Après une première étape de screening, par l'utilisation de la technologie dual priming oligonucleotide (DPO) (figure 32) (298), un test de confirmation par séquençage de nouvelle génération en utilisant la technologie Long Read de PacBio (Pacific Biosciences) a été réalisé.

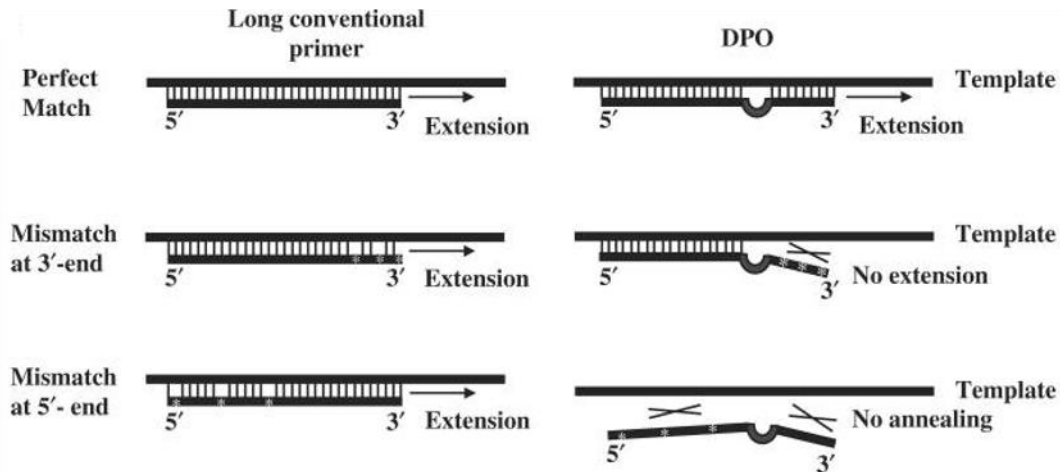


Figure 32 : Principe de la technologie dual priming oligonucleotide (DPO)

Le DPO est composé de trois régions : deux segments distincts d'amorces, dont l'un est plus long que l'autre, reliés par un linker de polydésoxyinosine. Le segment 5' plus long se lie préférentiellement à l'ADN matrice et permet une hybridation stable, tandis que le segment 3' plus court se lie sélectivement à son site cible et bloque l'hybridation non spécifique.

(Chun, 2007)

Dans la banque d'ADN de *P. falciparum* du CNR, la mutation Ile431Val de la *PfDHPS* la plus ancienne a été retrouvée dans des échantillons de patients ayant séjournés au Cameroun ou au Bénin, en 1997. Il s'agit, à ce jour, de la description la plus ancienne de cette mutation. En 1997, la mutation Ile431Val a été retrouvée avec la mutation Ser436Ala seule, ou associée à la mutation Ala437Gly, formant les allèles **vaAKAA** et **vagKAA**. Le premier allèle quintuple mutant **vagKgs** de la *PfDHPS* a été identifié sur un échantillon de patient ayant séjourné au Cameroun, en 2000. Parmi les échantillons porteurs de la mutation Ile431Val, les allèles **vagKgs** et **vagKAA** étaient les principaux allèles retrouvés. De 1997 à 2004, l'allèle **vagKAA** était plus fréquent que l'allèle **vagKgs**. Puis, une inversion de cette tendance a eu lieu : désormais il existe une prédominance de l'allèle **vagKgs**, comme nous l'avons montré dans notre première étude.

Pour étoffer les données relatives à l'historique d'émergence de la mutation Ile431Val, l'étude des marqueurs microsatellites de ces échantillons est en cours. Pour les allèles contenant la

mutation Ile431Val, les haplotypes microsatellites situées en aval du gène *Pfdhps*, étaient similaires à ceux précédemment décrits. Pour pallier à une des limites de notre étude, qui était l'utilisation de marqueurs microsatellites situés uniquement d'un seul côté du gène *Pfdhps*, deux autres marqueurs microsatellites, situés à 0,13 et 1,59 kb en amont de *Pfdhps* seront étudiés (299, 300).

#### 4.2. Etude phénotypique de la mutation Ile431Val de la PfdHPS

Il est désormais crucial de disposer de données phénotypiques pour confirmer ou infirmer, que la mutation Ile431Val et l'allèle quintuple mutant **vagKgs** confèrent un niveau accru de résistance à la SP. Pour ce faire, deux méthodologies sont actuellement mises en œuvre.

D'une part, la production, par *E. coli*, de protéines PfdHPS recombinantes, permettra d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques (Km) ainsi que les constantes d'inhibition (Ki) des différents mutants. Une bactérie *E. coli*, délétée pour le gène *folP* (*dhps*) nous a été fournie par Dr. Göte Swedberg (301). Puis, nous avons réalisé la transformation de cette bactérie avec les plasmides pGEX-6P-1 contenant les gènes *Pfdhps* codant pour les allèles sauvage, **vSAKAA**, **ISgKAA**, **vagKAA**, **vagKgs** et **ISgegA** de la PfdHPS. La suite de ce travail est en cours.

D'autre part, nous avons développé un modèle murin, en éditant le génome des parasites murins *P. berghei* avec la technologie CRISPR/Cas9, selon la méthodologie décrite par Yamauchi *et al.* (231). En effet, la découverte du fonctionnement de l'édition génique dirigée par CRISPR/Cas9, par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, récompensées par le prix Nobel de Chimie en 2020, a ouvert la voie à une multitude de nouveaux outils. Cette technologie permet de générer facilement des lignées mutantes de façon précise et rapide, à l'aide d'un ARN guide unique, d'une endonucléase (la protéine Cas9) et d'un ADN modèle portant la séquence à introduire dans la région génomique ciblée (227).

Pour ce faire, nous avons utilisé des parasites *P. berghei* transgéniques, exprimant constitutivement la Cas9 (228) et obtenu trois clones parasitaires de *P. berghei* porteurs d'une DHPS sauvage ou mutée sur les positions équivalentes de la mutation Ile431Val d'une part, et Ala437Gly d'autre part. La sulfadoxine a été administrée par voie orale, 4h, 24h, 48h et 72h après infection des souris avec ces clones parasitaires. Des posologies de 0, 1, 2 et 3 mg/kg de sulfadoxine ont été administrées. La parasitémie a été déterminée par frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa.

Chez les souris traitées par sulfadoxine et infectées avec les parasites ayant l'enzyme DHPS sauvage ou porteuse de la mutation Ile431Val, la parasitémie est restée indétectable sur la période étudiée (figure 33). A l'inverse, en cas d'infection par les parasites porteurs de la mutation Ala437Gly, une parasitémie était détectable dès le sixième jour d'infection, pour toutes les doses de sulfadoxine administrée. Contrairement à la mutation Ala437Gly, la mutation de Ile431Val isolée ne conférait pas, à elle seule, de résistance à la sulfadoxine.

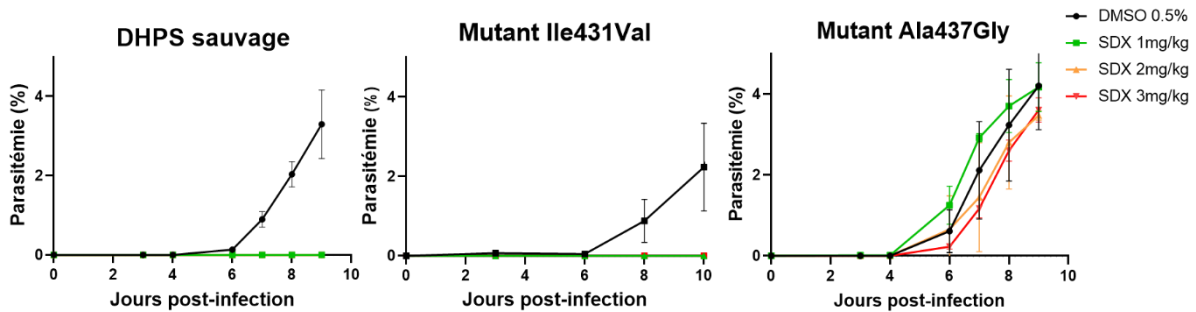


Figure 33 : Parasitémie après infection puis traitement par sulfadoxine

*P. berghei* DHPS sauvage, DHPS Ile431Val ou Ala437Gly ont été injectés par voie intrapéritonéale à 5 souris BALB/c. La sulfadoxine à 0, 1, 2 ou 3 mg/kg a été administrée par gavage 4 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures après l'infection.

DMSO : diméthylsulfoxyde ; SDX : sulfadoxine

Des travaux ultérieurs permettront de déterminer le fitness des différents mutants par co-infection.

A ce jour, il n'a pas été possible de construire des parasites *P. berghei* porteurs des cinq mutations de DHPS permettant d'évaluer le génotype **vagKgs**.

Ces évaluations phénotypiques *in vitro*, une fois complétées, seront à mettre en regard des résultats obtenus lors d'une étude observationnelle réalisée sur le terrain, à Yaoundé, au Cameroun.

### III. Effet du traitement préventif intermittent sur la sélection du quintuple mutant DHPS de *Plasmodium falciparum* chez les femmes enceintes

#### 1. Introduction

Les travaux de Mockenhaupt *et al.*, réalisés en 2000, montraient que, à l'accouchement, les isolats avec deux ou trois mutations de la *PfDHFR* étaient plus fréquents chez les femmes qui avaient reçu une prophylaxie par SP, par rapport aux femmes n'ayant pas reçu cette prophylaxie (200). Dans cette étude, la prise de SP était confirmée par le dosage de la pyriméthamine sérique. Puis, les travaux de Harrington *et al.*, réalisés en Tanzanie entre 2002 et 2005, ont montré une sélection de l'allèle IS $\text{gegA}$  de la *PfDHPS* chez les patientes bénéficiant d'un TPIg par SP (216). Cela s'explique par une durée de protection de la SP, contre les infections à *P. falciparum*, différente selon le génotype de la *PfDHPS*. Pour les parasites porteurs d'un génotype sauvage de la *PfDHPS*, la durée de protection est supérieure à 42 jours alors qu'elle est réduite à 12 jours pour les parasites porteurs des allèles IS $\text{gegA}$  (207).

A ce jour, aucune donnée phénotypique sur l'impact de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS* et de l'allèle  $\text{vagKgs}$  n'est disponible. Le nombre élevé de mutations suggère un niveau élevé de résistance à la sulfadoxine. En effet, il est décrit que le niveau de résistance à la SP semble être corrélé au nombre de mutations (98). Des études *in vitro*, montrant que l'accumulation de mutations de la *PfDHPS* augmente progressivement la tolérance du parasite à la sulfadoxine, corroborent cette hypothèse (118).



Cette étude a été réalisée en 2020, à Yaoundé, au Cameroun, chez des femmes enceintes impaludées. La relation entre l'utilisation de la prophylaxie à base de SP et les génotypes de la *PfDHPS* infectant les patientes a été étudiée. Le séquençage du gène *pf dhps* a été réalisée par méthode Sanger.

#### 2. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on selection of the new *P. falciparum* dhps quintuple mutant carrying the I431V mutation

Olivia Cohen<sup>†</sup>, Emilie Guemas<sup>†</sup>, Sandie Menard, Martial Tsague Kenfack, Carine Talom Ngassa, Xavier Iriart, Marlise Bidzogo Lebobo, Celestin Ondobo Ekae, Carole Eboumbou, Calvin Tiyou Kenmeni, Antoine Berry\*

J Antimicrob Chemother. 2023 Mar; 78(3):665-668. doi: 10.1093/jac/dkac432

# Effect of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on selection of the new *P. falciparum dhps* quintuple mutant carrying the I431V mutation

Olivia Cohen <sup>1,2†</sup>, Emilie Guemas<sup>1,2†</sup>, Sandie Menard<sup>2</sup>, Martial Tsague Kenfack<sup>3</sup>, Carine Talom Ngassa<sup>3</sup>, Xavier Iriart<sup>1,2</sup>, Marlise Bidzogo Lebobo<sup>3</sup>, Celestin Ondobo Ekae<sup>3</sup>, Carole Eboumbou<sup>4,5</sup>, Calvin Tiyou Kenmeni<sup>3,6</sup> and Antoine Berry <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Toulouse, Toulouse, France; <sup>2</sup>Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), CNRS UMR5051, INSERM UMR1291, UPS, Toulouse, France; <sup>3</sup>Centre d'Animation Sociale et Sanitaire (CASS) of Nkolndongo, Yaounde, Cameroon; <sup>4</sup>Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala, Douala, Cameroon; <sup>5</sup>Malaria Research Unit, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon; <sup>6</sup>University Hospital of Yaoundé, Yaoundé, Cameroon

\*Corresponding author. E-mail: berry.a@chu-toulouse.fr

†Equal contributions as first authors.

Received 13 October 2022; accepted 3 December 2022

**Background:** A new mutation in the *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase gene (*pf dhps*), I431V, has been identified in several countries of Central and West Africa. This mutation is mostly found in association with four other SNPs on *pf dhps* (S436A, A437G, A581G and A613S), forming a quintuple mutant (vagKgs) and almost always associated with the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene (*pf dhfr*) CirmI (C50R, N51I, S108N) triple mutant. To date, nothing is known about the impact of this new *pf dhps* genotype on sulfadoxine-pyrimethamine (SP) resistance.

**Objectives:** We sought to assess the prevalence of this *pf dhps* vagKgs quintuple mutant in two groups of pregnant women with malaria, one that took intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP) and one that did not.

**Methods:** The *pf dhfr* and *pf dhps* genes from *Plasmodium falciparum* isolates collected in Yaoundé (Cameroon) from pregnant women with symptomatic malaria under IPTp-SP or not, were sequenced.

**Results:** Of 159 patients evaluated, 70 had already taken SP during pregnancy and 89 had never taken SP. Only the vagKgs allele was significantly overrepresented in the SP+ group (21.4% versus 3.4%;  $P < 0.001$ ), whereas the ISgKAA mutant, widely distributed in this area and known to be less susceptible to SP, tended to be less abundant in this group (48.6% versus 64.0%;  $P = 0.0503$ ).

**Conclusions:** We found a strong overrepresentation of the CirmI/vagKgs haplotype in the IPTp-SP pregnant group, suggesting a high level of resistance of this mutant to SP. This could compromise not only the effectiveness of IPTp-SP but also the seasonal malaria chemoprevention of young children, now widely implemented.

## Introduction

Pregnancy-associated malaria remains a major public health issue in *Plasmodium falciparum* endemic countries.<sup>1</sup> Consequently, intermittent preventive treatment in pregnancy with sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP) has been adopted in most African endemic areas.<sup>2</sup>

Nevertheless, the effectiveness of sulfadoxine-pyrimethamine (SP) prophylaxis is compromised by the development of parasite resistance, notably due to mutations in *Plasmodium falciparum*

*dihydrofolate reductase* (*pf dhfr*) and *dihydropteroate synthetase* (*pf dhps*) genes, which encode enzymes targeted by pyrimethamine and sulfadoxine, respectively.<sup>3,4</sup> Five main SNPs associated with resistance have been described for *pf dhps* (S436A, A437G, K540E, A581G and A613S) and five for *pf dhfr* (C50R, N51I, C59R, S108N and I164L). Several studies have shown that the more mutations that accumulate in these two genes, the more resistant the parasite becomes.<sup>5</sup> A new mutation in *pf dhps*, I431V, was identified in Nigeria in 2007,<sup>6</sup> then in Cameroon in 2010,<sup>7</sup> and later in several countries of Central and West Africa.<sup>8</sup> This mutation was

mostly found in association with four other SNPs on *pfdhps* (S436A, A437G, A581G, A613S), forming a quintuple mutant (vagKgs). It is almost always associated with the *pfdhfr* CirnI (N51I, C59R, S108N) triple mutant, which already confers resistance and is widespread in Africa. The emergence of this new *pfdhps* genotype raises the question of its impact on SP resistance. The high number of mutations ( $n=5$ ) could suggest a high level of resistance, as is the case for genotypes combining A437G, K540E, A581G and/or A613S mutations found in Eastern and Southern Africa.<sup>9</sup> A decreased efficacy not only of IPTp-SP, but also of seasonal malaria chemoprevention (SMC) with SP plus amodiaquine (SP+AQ) would be impactful. Indeed, alternatives to SP such as dihydroartemisinin-piperaquine have not been adopted<sup>10</sup> because of the emergence of artemisinin resistance in Africa<sup>11</sup> and the huge cost and the inertia of this policy change.

The aim of this work was to assess the prevalence of the *pfdhps* vagKgs quintuple mutant (I431V, S436A, A437G, A581G, A613S) in two groups of women with malaria, one that took IPTp-SP and the other that did not.

## Materials and methods

### Study site and design

A prospective study was conducted between February 2020 and July 2020 in the maternity hospital of the CASS (Centre d'Animation Sociale et Sanitaire) of Nkolndongo in Yaounde (3°52'N, 11°31'E), Cameroon. In this study, as was usually done in CASS during the pregnancy follow-up, all pregnant women attending the prenatal consultation during the entire survey period were actively examined for symptoms suggestive of malaria. If symptoms were found, a rapid diagnostic blood test able to detect the *P. falciparum*-specific HRP2 antigen (SD Malaria Ag P.f/Pan<sup>®</sup>) was used. In case of a positive test, women were enrolled as volunteers after giving their informed consent. A drop of their blood, previously collected, was deposited on a filter paper (Whatman<sup>®</sup> FTA<sup>®</sup> Elute) for DNA conservation and *pfdhfr/pfdhps* sequencing. All participants who had a diagnosis of malaria received treatment following the national guidelines.

### PCR and Sanger sequencing

DNA was extracted from filter papers following the recommended protocol.<sup>12</sup> Screening for mutations in the *pfdhfr* and *pfdhps* genes was done as previously described.<sup>7</sup> PCRs were performed on a Veriti 96-Well Thermocycler (Applied Biosystems) and PCR products were sequenced using an ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The resulting sequences were analysed for nucleotide changes at each identified SNP by two separate investigators using the BioEdit sequence alignment editor version 7.2. For monoclonal samples (i.e. one signal for each nucleotide), one allele could be unequivocally determined. For multiclonal infections, we considered only the major genotype if it was present with at least a two-to-one ratio (i.e. the chromatogram signal of the minor sequence was less than half the intensity of the major one). Multiclonal infections with smaller ratios were excluded and considered mixed infections.

### Statistical analysis

Data were analysed with SigmaStat<sup>®</sup> for Windows version 2.03. Data that were not normally distributed were displayed as median values and were compared using a Mann-Whitney *U*-test for two-group comparisons. Proportions were compared using the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test as appropriate. A comparison was considered statistically significant if the *P* value was  $\leq 0.05$ .

## Ethics statement

All procedures involving human subjects used in this study were approved by the Cameroonian National Ethical Committee (statements no. 2020/12/1314/CE/CNERSH/SP).

## Results and discussion

Of 205 pregnant women included in the study during the longitudinal prospective survey, 46 were excluded from the analysis, 26 because of failed sequencing, presumably due to low parasite load, and 20 due to mixed infections making genotype identification unreliable.

Of the 159 evaluated patients, 70 women had taken at least one course of SP during their pregnancy (group SP+) and 89 had never taken SP (group SP-) (Figure S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online).

The two groups (SP- and SP+) were not significantly different in terms of age, primiparity (Table S1), mixed infection (7.2% versus 12.7%;  $P < 0.18$ ) or sequencing failure (12.6% versus 12.7%;  $P < 0.94$ ) (Figure S1). In contrast, women in the SP+ group had more weeks of amenorrhoea at inclusion and used a bed net more frequently (Table S1). This could be explained by the fact that the first dose of SP is prescribed at the beginning of the second trimester according to the recommendations, and that a bed net was systematically offered at the first prenatal consultation. The trend towards overrepresentation of HIV-positive patients observed in the SP- group could be explained by the fact that immunocompromised HIV-positive patients were already receiving co-trimoxazole prophylaxis, which contraindicates the use of SP due to their redundant mechanisms of action.<sup>2</sup>

Analysis of the distribution of SNPs in the two groups showed that the four SNPs, I431V, A437G, A581G and A613S, were strongly associated with the SP+ group (Table 1).

The prevalence of the combined *pfdhfr* (codons 50, 51, 59, 108 and 164) and *pfdhps* (codons 431, 436, 437, 540, 581 and 613) alleles in the SP- and SP+ groups is described in Table 2. For *pfdhfr*, 99.4% of patients were infected with the CirnI (N51I, C59R, S108N) triple mutated allele (Table 2). Thus, for the following results, we will only consider the *pfdhps* alleles associated with the CirnI *pfdhfr* allele. Only the vagKgs allele was significantly overrepresented in the SP+ group (21.4% versus 3.4%;  $P < 0.001$ ), whereas the ISgKAA mutant, widely distributed in this area and known to be less susceptible to SP,<sup>10</sup> was less abundant in this group (48.6% versus 64.0%;  $P = 0.0503$ ). These results suggest that the ISgKAA allele is less selected by IPTp-SP than the vagKgs one. This selection does not appear to be due solely to the I431V mutation because no evidence of an overrepresentation of the vagKAA allele in the SP+ group was found, although this comparison lacked adequate statistical power due to the small number of samples. Similarly, the A581G and A613S combination alone does not appear to be responsible for this selection because the IaAKgs or ISgKgs allele did not seem to be overrepresented in the SP+ group. The concomitance of SNPs seems to be required for resistant phenotype expression.

No vagKgs allele was found among HIV-infected patients (data not shown), and almost all of these patients followed in the CASS were prescribed co-trimoxazole, a treatment with a similar mechanism of action to SP. *In vitro* studies<sup>13</sup> have found a similar selection of co-trimoxazole and SP on antifolate-resistant parasites but this is not currently supported by *in vivo* data.<sup>14,15</sup> In

**Table 1.** Prevalence of SNPs in *pfdhfr* and *pfdhps* genes in both SP- and SP+ groups

group	n	<i>pfdhfr</i> SNP n (%)					<i>pfdhps</i> SNP n (%)				
		C50R	N51I	C59R	S108N	I164L	I431V	S436A	A437G	K540E	A581G
SP-	89	0 (0)	89 (100)	89 (100)	89 (100)	0 (0)	26 (29.2)	77 (86.5)	1 (1.1)	5 (5.6)	6 (6.7)
SP+	70	0 (0)	69 (98.6)	69 (98.6)	70 (100)	0 (0)	22 (31.4)	68 (97.1)	3 (4.3)	17 (24.3)	20 (28.6)
P value		1.000 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	0.076 <sup>b</sup>	0.019 <sup>b</sup>	1.000 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>b</sup>	<0.001 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Calculated by Fisher's exact test.

<sup>b</sup>Calculated by  $\chi^2$  test.

**Table 2.** Prevalence of combined *pfdhfr* (codons 50, 51, 59, 108, 164) and *pfdhps* (codons 431, 436, 437, 540, 581, 613) alleles in both SP- and SP+ groups

Allele		Number of mutations	Group		P value
<i>pfdhfr</i>	<i>pfdhps</i>		SP- n (%)	SP+ n (%)	
CNCnI	ISgKAA	2	0 (0)	1 (1.4)	0.44 <sup>a</sup>
CirnI	ISAKAA	3	4 (4.5)	0 (0)	0.13 <sup>a</sup>
CirnI	IaKAA	4	7 (7.9)	2 (2.9)	0.30 <sup>a</sup>
CirnI	ISgKAA	4	57 (64.0)	34 (48.6)	0.0503 <sup>b</sup>
CirnI	IagKAA	5	11 (12.4)	7 (10.0)	0.64 <sup>b</sup>
CirnI	ISgeAA	5	1 (1.1)	3 (4.3)	0.32 <sup>a</sup>
CirnI	ISgKgs	6	1 (1.1)	2 (2.9)	0.583 <sup>a</sup>
CirnI	IagKAs	6	1 (1.1)	3 (4.3)	0.32 <sup>a</sup>
CirnI	IaAKgs	6	1 (1.1)	0 (0)	1.000 <sup>a</sup>
CirnI	vagKAA	6	3 (3.4)	3 (4.3)	1.000 <sup>a</sup>
CirnI	vagKgs	8	3 (3.4)	15 (21.4)	<0.001 <sup>a</sup>
<b>Total</b>			89	70	

Wild-type amino acids are in uppercase and mutated amino acids are in lowercase and bold.

<sup>a</sup>Calculated by Fisher's exact test.

<sup>b</sup>Calculated by  $\chi^2$  test.

any case, no conclusions can be drawn because our study included only eight HIV-infected patients.

Chauvin *et al.*<sup>7</sup> conducted a similar study 10 years earlier in the same maternity hospital with a similar methodology. The prevalence of the *pfdhps* vagKgs mutant in the SP- group was not different in the two studies (2.0% versus 3.4%). Surprisingly, whereas there was no difference between the SP- ( $n=51$ ) and SP+ ( $n=49$ ) groups in Chauvin's study for the prevalence of this vagKgs mutant (2% versus 4.1%,  $P=0.614$ ), whereas in our study this prevalence in the SP+ group was markedly higher (21.4% versus 3.4%,  $P<0.001$ ). The smaller number of samples in the 2010 study alone cannot explain the magnitude of this discrepancy. One hypothesis would be that the prevalence of the vagKgs quintuple mutant has increased since 2010, but its detection could have passed under the radar. Indeed, vagKgs mutant parasites could suffer the cost of resistance, which would reduce their density when competing with sensitive parasites in the absence of treatment and, therefore, could make them undetectable with low-sensitivity tools.<sup>16-18</sup> This competition between parasites is particularly important when the multiplicity of infections is high, a situation observed in a high-level transmission area<sup>19</sup> such as southern Cameroon.<sup>13</sup> The persistence of this vagKgs mutant in human hosts in the absence of SP pressure may be related to the ability of the mosquito vector to favour minority clones during the sexual cycle of *P. falciparum*, as has been shown for the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter K76T mutant allele.<sup>20</sup> Thus, an increase in the prevalence of these vagKgs mutants would only be visible under selective pressure by SP.

### Conclusions

The strong overrepresentation of the CirnI/vagKgs haplotype in the IPTp-SP group suggests a high level of resistance of this

mutant to SP. This could compromise the efficacy of not only IPTp-SP but also of the now widely implemented SMC (SP+AQ), which is, to date, recognized as highly effective in protecting young children from seasonal malaria throughout the Sahelian belt.<sup>21</sup> Further studies are now required to determine the real impact of such parasites on SP prophylaxis, but also their distribution and prevalence.

## Acknowledgements

We acknowledge all the personnel and all the pregnant women who attended CASS, without whom this work would not have been possible.

## Funding

This work was supported by recurrent funds from Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), CNRS UMR5051, INSERM UMR1291, UPS, Toulouse, France.

## Transparency declarations

There are no conflicts of interest to declare.

## Supplementary data

Figure S1 and Table S1 are available as Supplementary data at JAC Online.

## References

- Rogerson SJ, Desai M, Mayor A et al. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 107–18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30066-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30066-5)
- World Health Organization. WHO policy brief for the implementation of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy using sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP). WHO, 2013. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HTM-GMP-2014.4>
- Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 9114–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.9114>
- Triglia T, Menting JG, Wilson C et al. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 13944–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13944>
- Plowe CV. The evolution of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; **103** Suppl 1: 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.11.002>
- Sutherland CJ, Fifer H, Pearce RJ et al. Novel pfdhps haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3405–10. <https://doi.org/10.1128/AAC.00024-09>
- Chauvin P, Menard S, Iriart X et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant pfdhfr/pfdhps alleles. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2566–71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv160>
- Wang X, Zhang X, Chen H et al. Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Central Africa between 2016 and 2021: wide geographic spread of highly mutated Pfdhfr and Pfdhps alleles. *Microbiol Spectr* 2022; **10**: e0200522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02005-22>
- Naidoo I, Roper C. Mapping “partially resistant”, “fully resistant”, and “super resistant” malaria. *Trends Parasitol* 2013; **29**: 505–15. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.002>
- Sundararaman SA, Odom John AR. Prevention of malaria in pregnancy: the threat of sulfadoxine-pyrimethamine resistance. *Front Pediatr* 2022; **10**: 966402. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.966402>
- Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. *N Engl J Med* 2021; **385**: 1163–71. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101746>
- Whatman. FTA-Elute-Applications. <https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2013/12/FTA-Elute-Applications-Whatman.pdf>
- Iyer JK, Milhous WK, Cortese JF et al. *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet* 2001; **358**: 1066–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06201-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06201-8)
- Juma DW, Muiruri P, Yuhas K et al. The prevalence and antifolate drug resistance profiles of *Plasmodium falciparum* in study participants randomized to discontinue or continue cotrimoxazole prophylaxis. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; **13**: e0007223. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007223>
- Chijioko-Nwauche I, Oguike MC, Nwauche CA et al. Antimalarial drug resistance markers in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative adults with asymptomatic malaria infections in Port Harcourt, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2021; **115**: 531–7. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tra061>
- Sarah-Matio EM, Guillochon E, Nsango SE et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and distribution of antimalarial drug resistance mutations in symptomatic and asymptomatic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; **66**: e0018822. <https://doi.org/10.1128/aac.00188-22>
- Bushman M, Morton L, Duah N et al. Within-host competition and drug resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Biol Sci* 2016; **283**: 20153038. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3038>
- Dumbo OK, Kayentao K, Djimde A et al. Rapid selection of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants by pyrimethamine prophylaxis. *J Infect Dis* 2000; **182**: 993–6. <https://doi.org/10.1086/315787>
- Eldh M, Hammar U, Arnot D et al. Multiplicity of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections and risk of clinical malaria: a systematic review and pooled analysis of individual participant data. *J Infect Dis* 2020; **221**: 775–85. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz510>
- Berry A, Menard S, Nsango SE et al. The rare, the best: spread of antimalarial-resistant *Plasmodium falciparum* parasites by *Anopheles* mosquito vectors. *Microbiol Spectr* 2021; **9**: e0085221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00852-21>
- ACCESS-SMC Partnership. Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and Central Africa: an observational study. *Lancet* 2020; **396**: 1829–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32227-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32227-3)

**Figure legends:**

Figure S1: Flow chart of participants throughout the study

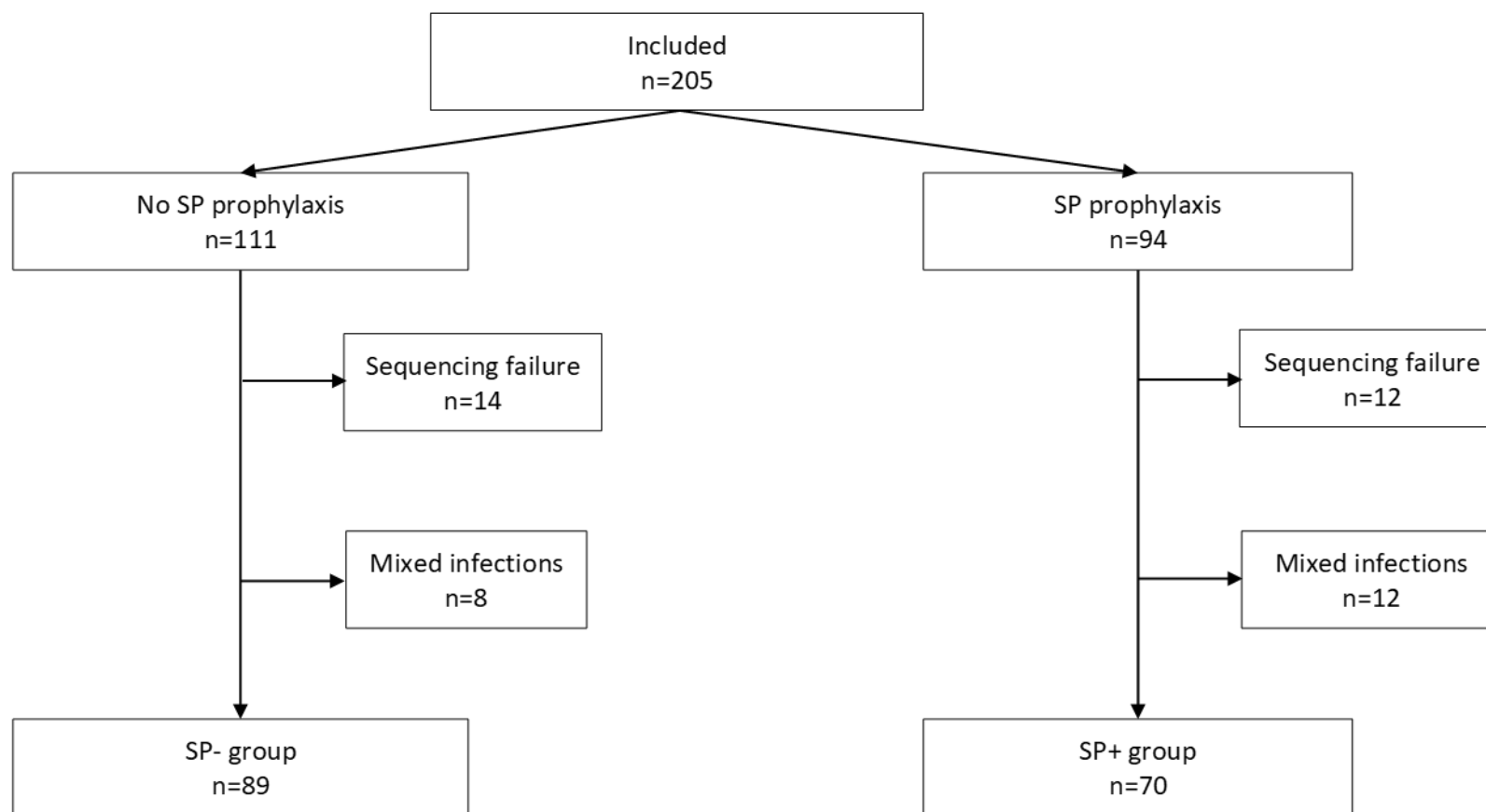


Table S1: Characteristics of patients

	SP-	SP+	P- value
	(n=89)	(n=70)	
Age (years), median [IQR]	25 [21-29]	25 [21-29]	0.89 <sup>a</sup>
Primiparity, %	25.9	34.3	0.25 <sup>b</sup>
Amenorrhea (weeks), median [IQR]	17 [12-22]	31 [25-34]	< 0.001 <sup>a</sup>
HIV +, %	7.9	1.4 <sup>d</sup>	0.14 <sup>c</sup>
Bed net use, %	61.4 <sup>d</sup>	77.1	0.034 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mann Whitney test

<sup>b</sup> Chi-square test

<sup>c</sup> Fisher's exact test

<sup>d</sup> missing data for 1 patient

### 3. Discussion

L'allèle **vagKgs** de la *PfDHPS* était le seul allèle significativement surreprésenté chez les femmes enceintes impaludées ayant bénéficié d'un TPIg par SP au moins une fois au cours de leur grossesse, par rapport aux femmes enceintes n'ayant pas reçu de SP. Il s'agit d'un argument indirect en faveur de la résistance à la sulfadoxine conférée par l'allèle **vagKgs**. A l'inverse, une précédente étude, menée à Yaoundé (Cameroun) en 2010-2011, n'avait pas mis en évidence une surreprésentation de cet allèle chez les femmes enceintes ayant reçu de la SP. Dans ce précédent travail, le nombre de femmes incluses était inférieur (193). De plus, une vaste étude menée dans les régions sahéliennes chez des enfants bénéficiant d'une CPS par SP et amodiaquine ne soutient pas cette hypothèse de la sélection des parasites porteurs de l'allèle **vagKgs** (66). Cependant, l'efficacité de l'amodiaquine, molécule partenaire de la SP pour la CPS, pourrait expliquer cette différence.

La sélection du quintuple mutant **vagKgs**, mis en évidence dans cette étude, ne semble pas être uniquement due à la mutation Ile431Val. En effet, l'allèle **vagKAA** n'est pas surreprésenté chez les femmes enceintes ayant reçu de la SP.

Ce travail présente plusieurs limites. D'une part, la technique de séquençage Sanger, utilisée dans ce travail, présente des limites lors d'une co-circulation de plusieurs clones de *P. falciparum*. Tout d'abord, la sensibilité de cette technique à mettre en évidence les clones minoritaires dans le cas des infections mixtes est limitée. Or, la prévalence des mutations de résistance est définie comme la proportion d'humains infectés qui portent au moins un clone parasitaire mutant. Puis, en cas de détection d'infection mixte, la technique Sanger ne permet pas de définir les différents allèles de la *PfDHPS*. Dans ce travail par exemple, 20 patientes ont été exclues du fait de la présence de plusieurs clones de *P. falciparum*, porteurs de différents allèles de *PfDHPS*. L'utilisation de nouvelles techniques de séquençage pourrait être pertinente pour lever cette limite. D'autre part, un biais de classement des femmes enceintes est possible, dû à l'absence de certitude de la prise de SP. Un dosage sérique de la sulfadoxine, comme ce qui a été réalisé par Mockenhaupt *et al.* pour la pyriméthamine (200), permettrait de confirmer la prise de sulfadoxine.

En vue des prochaines études sur le terrain, des techniques permettant d'affiner les résultats du génotype et de la prise de SP ont été développées.

## 4. Perspectives

### 4.1. Dosage sérique de la sulfadoxine

Un dosage sérique de la sulfadoxine et de la pyriméthamine, par chromatographie liquide à haute performance associée à la spectrométrie de masse (302), a été mis au point, en collaboration avec le laboratoire de pharmacologie du CHU de Toulouse. Ce dosage permettra, d'une part, de confirmer la prise de SP par la patiente, et d'autre part, d'étudier l'association entre le génotype de la *PfDHPS* et la concentration de sulfadoxine au niveau sérique.

### 4.2. Séquençage de *Pfdhps* par la technologie PacBio

L'utilisation de nouvelles techniques de séquençage entraîne une modification des données épidémiologiques. En utilisant le séquençage d'amplicons par Illumina, Olukosi *et al.* ont identifié la mutation Lys540Glu dans 18,6 % des échantillons au Nigéria, en 2021 (303). Les clones porteurs de cette mutation étaient toujours minoritaires dans les échantillons, allant de 1% à 17% par échantillon. Ces clones minoritaires n'auraient pas été mis en évidence par la technique de séquençage de type Sanger.

Une nouvelle étude observationnelle sur le terrain a été réalisée au Centre d'Animation Sociale et Sanitaire (CASS) à Yaoundé (Cameroun), en 2023-2024. Les prélèvements de sang de patients impaludés ont été réalisés, en population générale (groupe population générale), chez des femmes enceintes ayant bénéficié d'au moins une dose de SP au cours de leur grossesse (groupe SP+) ou non (groupe SP-).

Les génotypes de la *PfDHPS* ont été déterminés en utilisant du séquençage de nouvelle génération, avec la technologie long read Pacific Biosciences. Brièvement, après une amplification du gène *Pfdhps*, la taille et la concentration d'ADN des produits PCR a été évaluées. Ces produits, disposant d'un code-barre, ont été regroupés et l'ADN a été purifié à l'aide des billes de purification SMRTbell (PacBio, Californie, États-Unis). La librairie a été préparée à l'aide du kit SMRTbell prep kit 3.0 (PacBio, Californie, États-Unis). Puis le séquençage a été réalisé le Sequel II. Les 3 000 reads de meilleures qualités ont été retenus pour chaque échantillon.

L'utilisation de cette technologie pour la détermination des génotypes de la *PfDHPS* a permis d'identifier les clones minoritaires de *P. falciparum*. L'étude de ces populations minoritaires permet de donner une description plus précise de l'épidémiologie des génotypes de *PfDHPS* circulants.

Les résultats préliminaires de ce travail sont présentés sur 159 patients, 51 étaient des femmes enceintes ayant pris au moins une dose de SP pendant leur grossesse (groupe SP+), 36 étaient des femmes enceintes n'ayant jamais pris de SP au cours de cette grossesse (groupe SP-) et les autres n'étaient pas des femmes enceintes (groupe population générale). Dans les 3 populations de l'étude, une fréquence plus importante de l'allèle **vagKgs** a été mise en évidence par la technologie PacBio, par rapport à la fréquence retrouvée en utilisant la technologie Sanger (figure 34). En utilisant la technologie long read PacBio, la fréquence de l'allèle quintuple mutant **vagKgs** était de 22,2%, 27,8% et 33,3% chez les patients de la population générale, du groupe SP- et SP+, respectivement. A l'inverse, il n'était identifié que chez 1,4%, 11,1% et 13,7% de ces mêmes patients par la technologie Sanger.

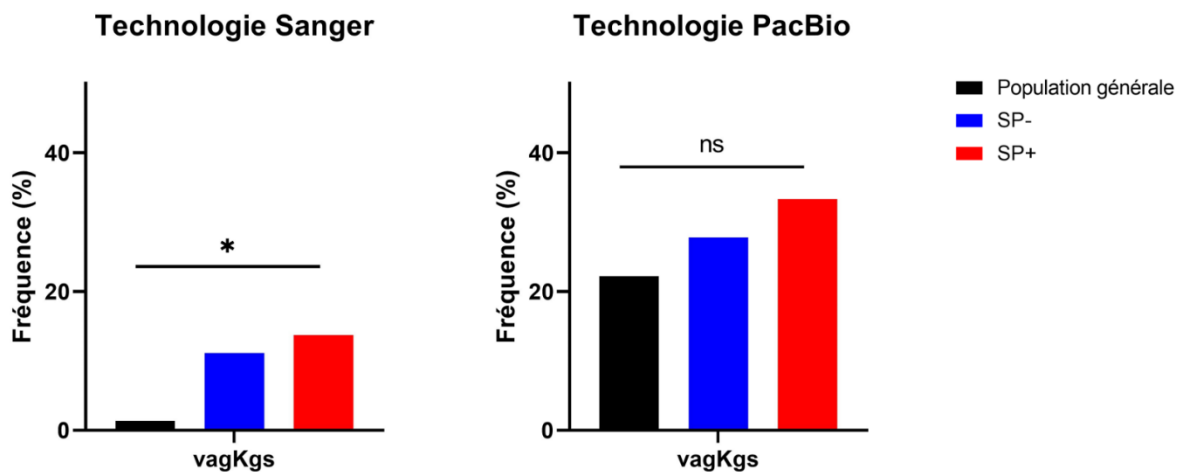


Figure 34 : Fréquence de l'allèle *vagKgs* selon la technologie de séquençage utilisée

Prélèvements réalisés au Cameroun en 2023-2024 en population générale ( $n=72$ ), chez des femmes enceintes n'ayant pas eu de TPIg par SP (SP- ;  $n=36$ ) et chez des femmes enceintes ayant bénéficié d'au moins une dose de SP au cours de leur grossesse (SP+ ;  $n=51$ ). Le test statistique utilisé est le test exact de Fisher. Les génotypes de la *PfDHPS* ont été déterminés par technologies sanger et long read Pacific Biosciences.

En utilisant la technologie PacBio pour le séquençage, aucun allèle n'était surreprésenté chez les femmes enceintes impaludées ayant bénéficié d'un TPIg par SP au moins une fois cours de leur grossesse, par rapport à la population générale ou aux femmes enceintes n'ayant pas reçu de SP. Le changement de technologie de séquençage est la première hypothèse expliquant que les résultats de l'étude précédente ne soient pas retrouvés. En effet, les allèles minoritaires sont désormais déterminés en utilisant la technologie long read PacBio. Un biais de classement de

la prise de SP par les femmes enceintes est la deuxième hypothèse. Dans cette étude, la prise de SP au cours de la grossesse est une information déclarative. Le dosage sérique de la sulfadoxine, que nous avons développé, permettra confirmer la prise de SP par la patiente.

Une lutte efficace contre le paludisme nécessite une bonne compréhension des mécanismes d'action des antipaludiques et de résistance mis en jeu par le parasite. Ainsi, la prise en compte des aspects structuraux et fonctionnels est essentielle. La dynamique moléculaire permet d'obtenir une connaissance de la structure atomique de la PfDHPS, à l'échelle de l'angström.

#### IV. Impact des mutations sur le site actif de la *PfDHPS* et sur la liaison à la sulfadoxine

##### 1. Introduction

La faisabilité des études computationnelles a longtemps été limitée par le manque de structure de l'enzyme *PfDHPS*. Les premiers travaux l'étudiant par dynamique moléculaire ont été réalisés à partir de structures obtenues par homologie (274, 278). Les premières structures cristallines, résolues par cristallographie aux rayons X, ont été publiées récemment par Chitnumsub *et al.* (254). Ces premières structures contiennent cependant quelques parties manquantes, notamment au niveau des inserts spécifiques à *P. falciparum*.

Les différentes mutations de la *PfDHPS* peuvent affecter les propriétés structurales de l'enzyme telles que sa conformation ou la structure de son site actif, mais également les propriétés dynamiques telles que la stabilité de son site actif et donc sa réactivité.

Ce travail de dynamique moléculaire, en utilisant le logiciel AMBER (267), a été réalisé à partir d'une structure cristalline récemment disponible de la *PfDHPS* comme point de départ (254). Cette étude a permis de caractériser les propriétés conformationnelles et dynamiques de l'enzyme sous sa forme sauvage (ISAKAA) avec, d'une part son substrat naturel (*pABA*) et, d'autre part un inhibiteur : la sulfadoxine. Puis, l'impact des différentes mutations, sous différentes combinaisons, a été évalué par l'étude de 7 systèmes différents correspondant à 7 mutants de l'enzyme. Les effets de ces mutations sur la structure de la *PfDHPS* et de ses interactions avec le *pABA* et la sulfadoxine ont été étudiés, avec une attention particulière portée à la mutation Ile431Val qui était présente dans 4 de ces systèmes.

##### 2. Deciphering the impact of mutations in *PfDHPS* active site and sulfadoxine binding: structural insights from molecular dynamics simulations

*Emilie Guémas, Sandie Ménard, Nicolas Jeanne, Georges Landa, Antoine Berry et Marie Brut*  
Molecules. 2025;30(20):4118 doi : 10.3390/molecules30204118

## Article

# Deciphering the Impact of Mutations on *Pf*DHPS Active Site and Sulfadoxine Binding: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations

Emilie Guémas<sup>1,2,3,\*</sup> , Sandie Ménard<sup>2</sup> , Nicolas Jeanne<sup>1,2</sup> , Georges Landa<sup>1</sup> , Antoine Berry<sup>2,3</sup>   
and Marie Brut<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS)-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31031 Toulouse, France; jeanne.n@chu-toulouse.fr (N.J.); georges.landa@laas.fr (G.L.); marie.brut@laas.fr (M.B.)

<sup>2</sup> Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, CNRS UMR 5051, INSERM UMR 1291, 31024 Toulouse, France; sandie.menard@inserm.fr (S.M.); berry.a@chu-toulouse.fr (A.B.)

<sup>3</sup> Service de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Toulouse, 31300 Toulouse, France

\* Correspondence: guemas.e@chu-toulouse.fr

## Abstract

The antimalarial combination of sulfadoxine–pyrimethamine is used as a preventive treatment in pregnant women and children in Africa. Sulfadoxine inhibits the *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (*Pf*DHPS), but resistance has emerged through point mutations in this enzyme. In this study, we investigate the impact of mutations on the structural and dynamic properties of *Pf*DHPS using molecular dynamics simulations. Our results show that *Pf*DHPS maintains overall structural integrity across various combinations of resistance-associated mutations. However, significant differences emerge in ligand binding. Sulfadoxine binding is particularly impacted and shows reduced stability in the mutant systems compared to the wild-type enzyme, while the natural substrate generally maintains stable or even enhanced binding affinity. A key finding is the critical role of the D2 loop, whose conformational flexibility influences ligand retention. In mutant enzymes, the disruption of interactions between the D2 loop and the natural substrate correlates with decreased affinity. In contrast, specific mutations in the loop are associated with an increased affinity. Conversely, sulfadoxine binding is associated with an open D2 loop conformation, facilitating its release from the active site. Finally, the intrinsic flexibility of sulfadoxine emerges as an important determinant of this process. Together, these results provide molecular-level insights into the mechanisms of resistance in *Pf*DHPS and establish a structural and dynamic framework for future investigations into its catalytic function and inhibitor design.

**Keywords:** dhps; sulfadoxine; *Plasmodium falciparum*; drug resistance; molecular dynamic simulations



Academic Editor: Anna Maria Almerico

Received: 28 August 2025

Revised: 30 September 2025

Accepted: 10 October 2025

Published: 17 October 2025

**Citation:** Guémas, E.; Ménard, S.; Jeanne, N.; Landa, G.; Berry, A.; Brut, M. Deciphering the Impact of Mutations on *Pf*DHPS Active Site and Sulfadoxine Binding: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Molecules* **2025**, *30*, 4118. <https://doi.org/10.3390/molecules30204118>

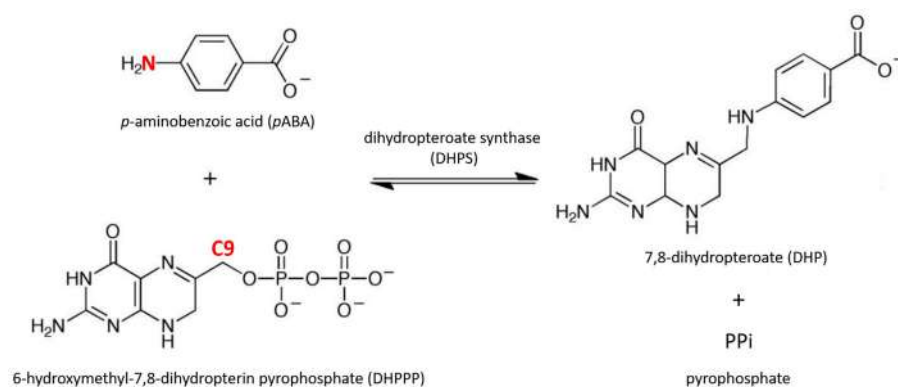
**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Malaria remains a devastating infectious disease, with high morbidity and mortality among pregnant women and children. The antimalarial sulfadoxine–pyrimethamine (SP) combination is used for intermittent preventive treatment in pregnant women throughout Africa. Moreover, seasonal malaria chemoprevention with SP plus amodiaquine has been

implemented in nineteen countries in sub-Saharan Africa for children under five years of age [1].

Sulfadoxine (SDX) and pyrimethamine act synergistically on the obligate folate biosynthesis pathway of *Plasmodium falciparum* parasite, by inhibiting dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), respectively. *Plasmodium falciparum* DHPS is fused to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase (HPPK) to form HPPK-DHPS, a bifunctional enzyme that catalyzes sequential reactions in the folate biosynthesis pathway. HPPK catalyzes the transfer of a pyrophosphate group from ATP to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin to form 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP). Then, DHPS catalyzes the condensation of DHPPP to *p*-aminobenzoic acid (*p*ABA) to form 7,8-dihydropteroate (DHP) as a substrate for folate synthesis (Figure 1) [2]. SDX competes with *p*ABA by mimicry, inhibiting DHP synthesis and thus reducing the synthesis of tetrahydrofolate, essential, in particular, for parasite DNA synthesis.

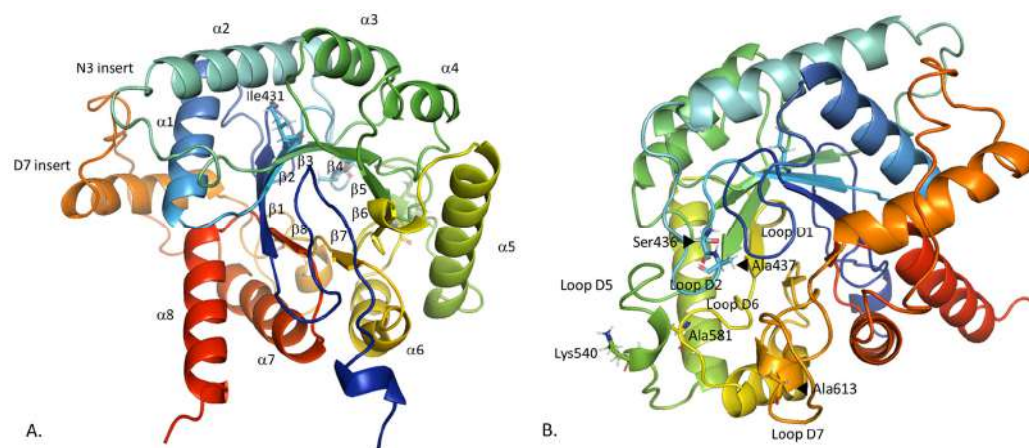


**Figure 1.** Reaction catalyzed by dihydropteroate synthase. DHPS facilitates the condensation of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) with *p*-aminobenzoic acid (*p*ABA) to form 7,8-dihydropteroate (DHP) and releases pyrophosphate. During the reaction, a covalent bond forms between the N atom of *p*ABA and C9 atom of DHPPP (highlighted in red).

*Plasmodium falciparum* has developed resistance to SDX due to point mutations in *Pf*DHPS. So far, six main point mutations (Ile431Val, Ser436Ala, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly, Ala613Ser) have been reported, with uneven frequencies across the African continent. These mutations are located within four flexible and conserved loops (Ser436 and Ala437 in the loop D2 (residues 433–444), Lys 540 in the loop D5 (530–547), Ala581 in the loop D6 (576–583) and Ala613 in the loop D7 (605–619)), with the exception of Ile431 located in the  $\beta$ 2-strand (residues 428–432) (Figure 2) [3]. Ile431 is the last described point mutation, found in 2007 in Nigeria [4], then in Cameroon in 2010 [5]. The quintuple mutant vagKgs (Ile431Val, Ser436Ala, Ala437Gly, Ala581Gly and Ala613Ser) is the most common allele carrying this mutation (*Pf*dhps alleles are named according to the amino acid present at positions 431, 436, 437, 540, 581, and 613; the wild-type (WT) amino acid is stated in uppercase, and the mutated amino acid in lowercase). These mutations are being monitored as they have emerged in West Africa, without any clinical evidence of resistance [6]. The triple mutant ISgegA (Ala437Gly, Lys540Glu and Ala581Gly) is associated with a high level of resistance and is found with a high prevalence in Eastern and Southern Africa [7]. The combination of Lys540Glu and Ile431Val mutations has not been observed in any published data [6].

In this study, we investigate the effects of mutations on the structural and dynamic properties of the *Pf*DHPS enzyme. Prior to the availability of the crystal structure, molecular dynamics (MD) had already been used to address SDX resistance, but relying on homology models [8,9]. Here, we worked on the *Pf*DHPS crystal structure, first released in 2020 [3], using it as a starting model that we completed, and conducted extensive MD simulations

to assess the impact of key mutations on the protein structure, as well as its binding to both the natural substrate (*p*ABA) and its inhibitor (SDX). Multiple combinations of *Pf*DHPS mutations, guided by epidemiological data, have been systematically investigated. Particular attention is given to the Ile431Val mutation, with the aim of gaining deeper mechanistic insight into the molecular basis of SDX resistance in *P. falciparum*.



**Figure 2.** Annotated view of the Wild-Type *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase. The view towards the barrel (A) and rotate 90° along the vertical axis (B). The six main point mutations are represented in (B) except the Ile431 for clarity. Ile431 is located in the  $\beta$ 2-strand, Ser436 and Ala437 in the loop D2, Lys540 in the loop D5, Ala581 in the loop D6 and Ala613 in the loop D7. Loops D1 (residues 397–410), D2 (433–444), D3 (483–485), D4 (504–510), D5 (530–547), D6 (576–583), D7 (605–619) and D8 (687–689).  $\beta$ 1-strand (residues 390–396),  $\beta$ 2-strand (428–432),  $\beta$ 3-strand (478–482),  $\beta$ 4-strand (500–503),  $\beta$ 5-strand (525–529),  $\beta$ 6-strand (572–575),  $\beta$ 7-strand (602–604) and  $\beta$ 8-strand (684–687).  $\alpha$ 1-helice (411–424),  $\alpha$ 2-helice (445–461),  $\alpha$ 3-helice (486–494),  $\alpha$ 4-helice (511–518),  $\alpha$ 5-helice (549–565),  $\alpha$ 6-helice (584–597),  $\alpha$ 7-helice (664–680) and  $\alpha$ 8-helice (690–704). Insert N3 (466–472), insert D7 (620–660).

## 2. Results

### 2.1. Comparison of the Constructed *Pf*DHPS Structure with the AlphaFold2 Prediction

The crystal structure of *Pf*DHPS was recently published, but with missing parts [3]. In this work, the initial structure of WT *Pf*DHPS obtained by filling in the missing parts of the PDB entry 6JWQ (83 residues) with DHPS from *P. falciparum* and *P. vivax*, was compared with the structure predicted by AlphaFold2 [10]. The predicted local distance difference test (pLDDT) of the *Pf*DHPS structure obtained with AlphaFold2 corresponds to high confidence (87.739). In both cases, we identify the DHPS classical triosephosphate isomerase (TIM) barrel  $\alpha/\beta$  structure with eight  $\alpha$ -helices and eight  $\beta$ -strands (Figure 2). The primary structural difference between the two models lies in the insert D7 (residues 620–660). Structural alignment provides a RMSD of 0.260 Å over 252 retained residues, indicating strong agreement between the models (Figure S1). Most of the excluded residues correspond to insert D7, which is not solved in experimental structures and is poorly defined in the AlphaFold2 prediction. Moreover, this insert is assumed to be involved and stabilized at the *Pf*HPPK-DHPS dimer interface [3]. Accordingly, we consider the observed conformational variability in insert D7 to be acceptable in the monomeric form and sufficiently distant from the active site not to affect our conclusions. In the following part, our results support this assumption.

## 2.2. Compared Dynamics Properties of the Wild-Type and Mutated PfdHPS in Complex with pABA

As expected, the total energy of the eight systems is constant during the 200 ns production runs, ensuring the simulations are stable (Figure S2). RMSD values were computed along the trajectories both including and excluding the insert D7 region (Figure S3). When all PfdHPS residues are considered, average RMSD values range from  $3.58 \pm 0.63$  Å (vagKgs) to  $6.20 \pm 0.69$  Å (WT) (Table 1). Upon exclusion of insert D7 residues, these values decrease significantly, ranging from  $2.55 \pm 0.38$  Å (ISgKAA) to  $2.94 \pm 0.50$  Å (IagKAA). These results indicate that PfdHPS structures remain stable over time if we exclude the flexible insert D7.

**Table 1.** Root mean square deviation (RMSD) of the eight PfdHPS systems bound to their natural ligands over 200 ns of molecular dynamics simulations, calculated with and without inclusion of the insert-D7 residues.

	With Insert D7	Without Insert D7
	Average $\pm$ Std. Dev. (Å)	Average $\pm$ Std. Dev. (Å)
WT	$6.20 \pm 0.69$	$2.73 \pm 0.23$
ISgKAA	$4.85 \pm 1.04$	$2.55 \pm 0.38$
IagKAA	$4.91 \pm 0.93$	$2.94 \pm 0.50$
vSAKAA	$4.08 \pm 0.73$	$2.87 \pm 0.51$
vagKAA	$4.94 \pm 1.63$	$2.69 \pm 0.41$
vagKgs	$3.58 \pm 0.63$	$2.59 \pm 0.33$
ISgegA	$4.56 \pm 1.85$	$2.80 \pm 0.51$
vagegs	$4.28 \pm 1.16$	$2.92 \pm 0.57$

### 2.2.1. Insert D7 Instability

The conformational instability of insert D7 (residues 620 to 660) is clearly highlighted by the RMSF analysis (Figure 3). Indeed, among the eight systems bound to the natural ligands DHPPP and pABA, this region consistently exhibits the highest RMSF values. Notably, the WT system displays the lowest flexibility for this sequence (maximum at 8.28 Å), whereas the vagKAA and ISgegA systems show the greatest fluctuations, with maxima of 13.43 Å and 13.90 Å, respectively.

### 2.2.2. Loop Flexibility

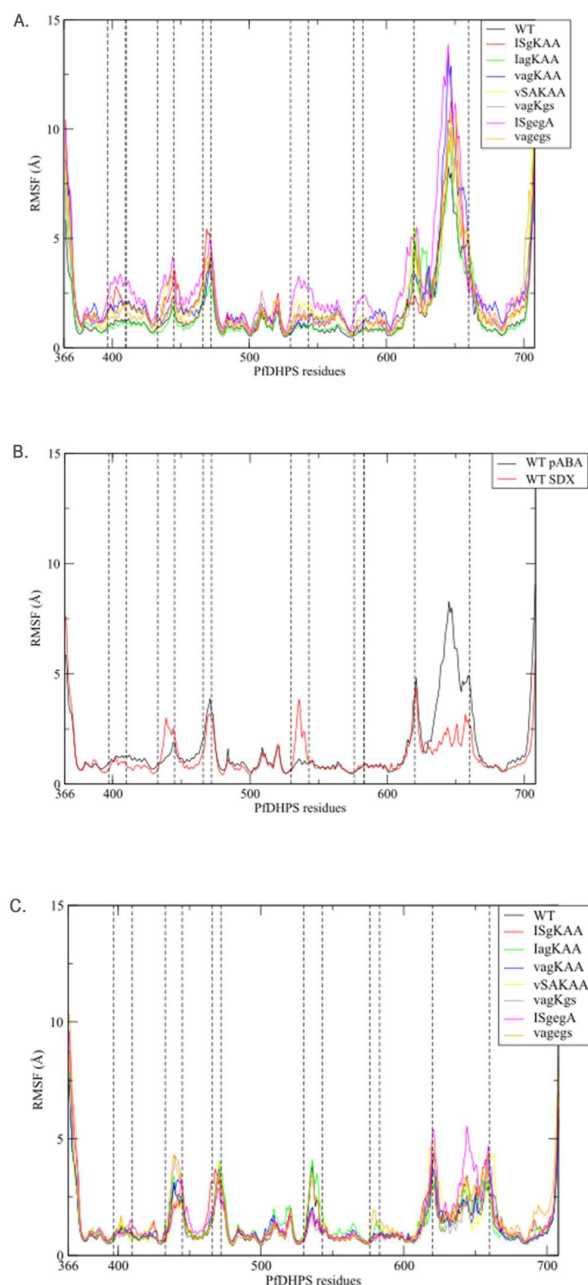
Distinct differences in loop conformational dynamics are observed across the simulated systems. Specifically, loops D1 (residues 397–410), D2 (433–444), D5 (530–547) and D6 (576–583), and the insert N3 (466–472) exhibit varying degrees of flexibility throughout the simulations. The highest fluctuations are observed in the ISgegA system in these regions, with RMSF maxima of 3.36 Å for loop D1, 4.17 Å for D2, 3.28 Å for D5 and 2.40 Å for D6. In contrast, the WT and IagKAA enzymes display comparatively reduced loop flexibility across these regions. In the following section, we explore how the dynamic behavior of these loops relates to the interaction network within the active site.

## 2.3. Conformational Analysis of PfdHPS Active Site in Complex with pABA

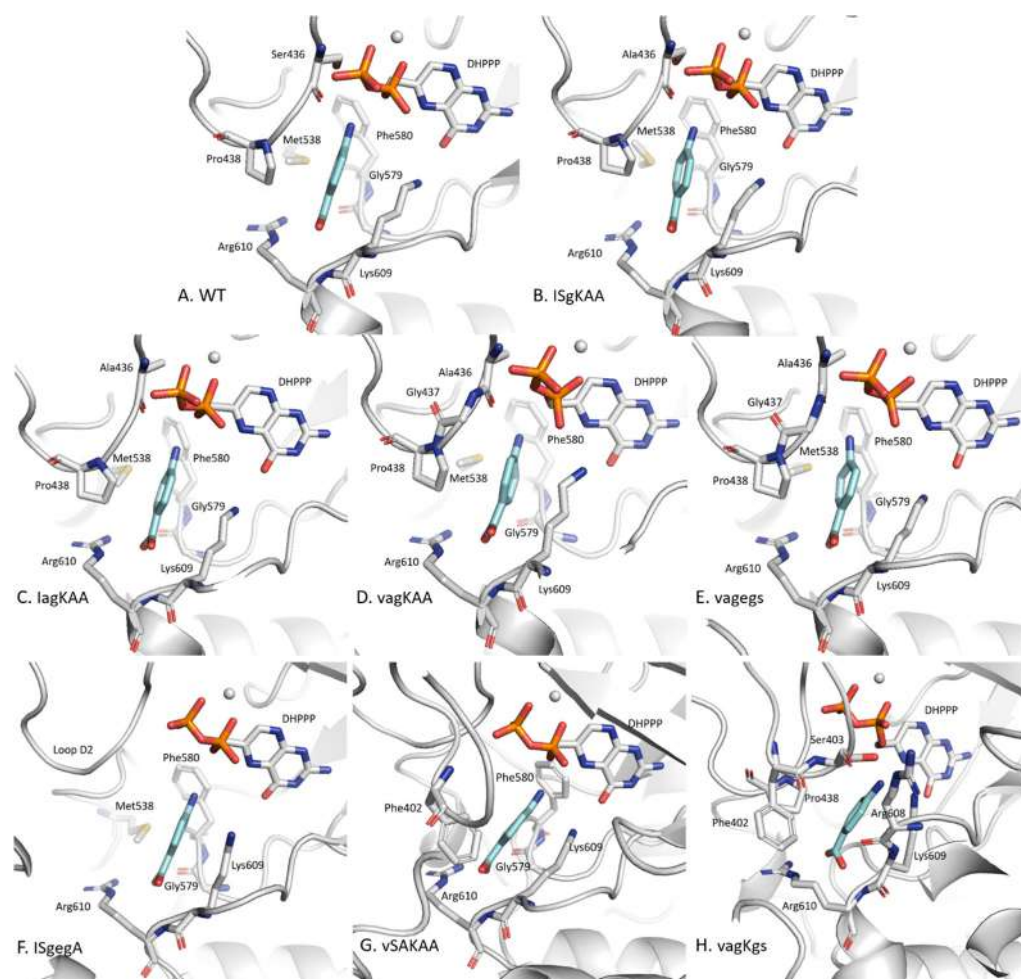
For each system, we conducted a detailed analysis of the structural arrangement and stability of the active site. Intermolecular interactions were characterized using IGMPLOT (version 3.03) [11], using the cluster representative structure as a reference. To validate the relevance of the identified interactions over time, a native contact analysis was also performed throughout the trajectories, confirming the persistence of key residue-ligand contacts throughout the simulations.

### 2.3.1. *p*ABA Binding Pocket

IGMPlot data show that seven key residues from the WT system are interacting with *p*ABA (Table S2). All of these residues are located on loops D2 (Ser436 and Pro438), D5 (Met538), D6 (Gly579 and Phe580), and D7 (Lys609 and Arg610). These residues are all found in 4 other systems: ISgKAA, IagKAA, vagKAA and vagegs (Figure 4), forming an identical binding pocket. Native contact analysis also indicates interactions with the residue Ala437, located on loop D2, except for ISgKAA, which is not involved in ISgKAA/*p*ABA interaction. Among these residues, 436 and 437 are known to be point mutations, and residues 538, 579–580 and 609–610 are close to point mutations 540, 581 and 613, respectively.



**Figure 3.** Root mean square fluctuation (RMSF) (A) of the eight systems bound to natural ligands (*p*-aminobenzoic acid (*p*ABA) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate) over 200 ns of molecular dynamics simulations, (B) of the wild-type (WT) *PfdHPS* with natural ligands (black) and with sulfadoxine (red) during 200 ns of molecular dynamics simulations, and (C) of the eight systems with sulfadoxine (SDX) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate during 200 ns of molecular dynamics simulations.



**Figure 4.** Residues involved in the *pABA* pocket for *PfDHPS* variants: (A) WT, (B) ISgKAA, (C) IagKAA, (D) vagKAA, (E) vagegs, (F) ISgegA, (G) vSAKAA and (H) vagKgs. *pABA* is shown in blue. The seven residues constituting the *pABA* pocket are conserved across systems (A) to (E) and are located on the following loops: Ser436 (or Ala436) and Pro438 (loop D2), Met538 (loop D5), Gly579 and Phe580 on loop D6, Lys609 and Arg610 on loop D7.

In the ISgegA system, the *pABA* binding pocket differs significantly and is characterized by the absence of D2 loop involvement and a reduced number of interactions with the enzyme (Figure 4). Only five residues interact with *pABA*: Met538 (loop D5), Gly579 and Phe580 (loop D6), and Lys609 and Arg610 (loop D7). This altered interaction network likely contributes to the elevated D2 loop flexibility in the RMSF analysis.

Unlike the other systems, loop D1 contributes to the *pABA* binding pocket in both the vSAKAA and vagKgs systems. In the vSAKAA system, the main interacting residues are Phe402 (loop D1), Gly579 and Phe580 (loop D6), and Lys609 and Arg610 (loop D7). Native contact analysis further reveals additional interactions with Ser436 (loop D2) and Met538 (loop D5), suggesting a more extensive and stabilizing interaction network in this mutant.

### 2.3.2. The Distinctive Case of the vagKgs System

Among all systems studied, the vagKgs mutant exhibits the most pronounced differences in the composition of the *pABA* pocket. Notably, we identify key interacting residues including Phe402 and Ser403 (loop D1), Pro438 (loop D2), and Arg608, Lys609, and Arg610 (loop D7). Native contact analysis also reveals interactions with Ser437 (loop D2), as well as Gly579 and Phe580 (loop D6). While residues Gly579 and Phe580 (loop D6), along with Lys609 and Arg610 (loop D7) are consistently involved in the *pABA* binding pocket across

all systems, Met538 (D5 loop) which participates in the binding with *p*ABA pocket in every system, except *vagKgs*. These variations suggest a distinct binding mode in this mutant, potentially impacting ligand affinity.

### 2.3.3. Binding Energies

The above results are consistent with the binding free energy values found for *p*ABA and calculated using the MM/GBSA method (Table 2). The ISgegA system, which involves only five interacting residues, is associated with the weakest binding affinity, with a binding free energy value of  $-16.51$  kcal/mol. In contrast, the *vagKgs* system, which includes four additional residues, shows the strongest binding energy ( $-23.60$  kcal/mol). The five systems sharing a nearly identical *p*ABA binding pockets (WT, ISgKAA, IagKAA, *vagKAA* and *vagegs*) display similar binding free energy values ( $-19.72$  kcal/mol for WT). The ISgKAA system shows the least favorable binding energy ( $-18.42$  kcal/mol), which may be attributed to the absence of residue 437 in the interaction network. Among the systems, all four mutant systems carrying mutations on sites 436 and 437 exhibit increased affinity for *p*ABA.

**Table 2.** Binding free energies of *p*ABA calculated using Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) method. For each system, 98,000 snapshots from the last 198 ns of the molecular dynamics trajectory were used for the calculation.

	Average (kcal/mol)	Std. Dev. (kcal/mol)
WT	$-19.72$	2.85
ISgKAA	$-18.42$	3.42
IagKAA	$-20.43$	2.79
<i>vSAKAA</i>	$-18.41$	3.96
<i>vagKAA</i>	$-19.79$	3.86
<i>vagKgs</i>	$-23.60$	3.69
ISgegA	$-16.51$	4.89
<i>vagegs</i>	$-20.33$	2.74

To further investigate the stability of *p*ABA within the active site, we also monitored the evolution of its position relative to that of DHPPP. Given that *Pf*DHPS catalyzes the condensation of *p*ABA and DHPPP via a covalent bond between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen atom of *p*ABA (Figure 1), this interatomic distance was measured across each system over the 200 ns of molecular dynamics simulations and is reported in Table 3. The shortest distances (ranging from  $3.43$  Å to  $3.60$  Å) are observed in the four systems carrying the S436A and A437G mutations, coinciding with those previously identified as having an increased affinity for *p*ABA. Among these, the three shortest distances are found in systems that also carry the I431V mutation. These results suggest that specific combinations of mutations, particularly S436A, A437G, and I431V, may have a more favorable positioning of *p*ABA relative to DHPPP.

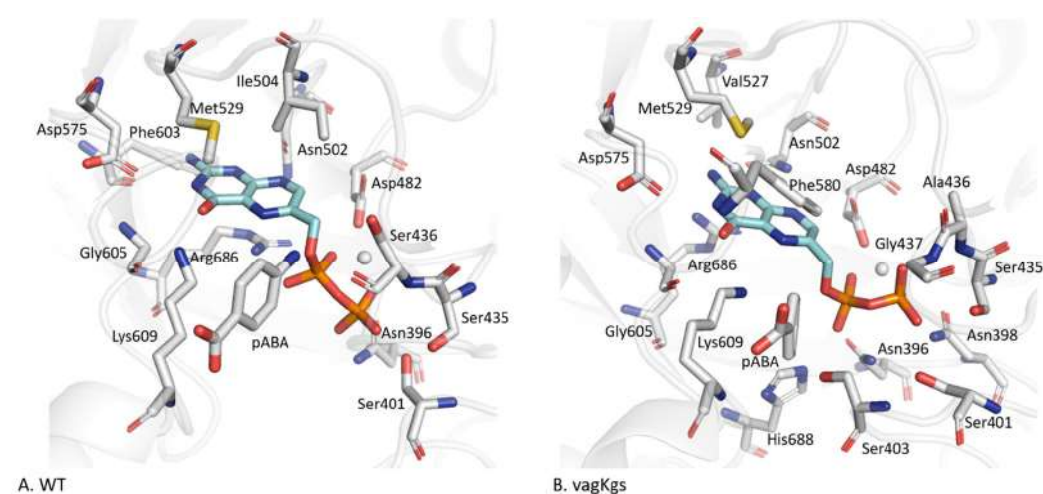
### 2.3.4. DHPPP Binding Pocket

Unlike the residues forming the *p*ABA binding site, those interacting with DHPPP are mainly located on the  $\beta$ -sheet core of the protein (Table S3). In the WT system (Figure 5A), IGMPlot identifies thirteen key residues involved in DHPPP binding: Asn396 ( $\beta$ -sheet  $\beta$ 1), Ser401 (loop D1), Ser435 and Ser436 (D2), Asp482 ( $\beta$ 3), Asn502 ( $\beta$ 4), Ile504 (D4), Met529 ( $\beta$ 5), Asp575 ( $\beta$ 6), Phe603 ( $\beta$ 7), Gly605 and Lys609 (D7) and Arg686 ( $\beta$ 8). Native contact analysis further reveals interactions with additional residues, including Glu434, Ala437 (loop D2), Val527 ( $\beta$ -sheet B5) and Phe580 (loopD6). Overall, seven of the eight  $\beta$ -sheets contribute to the DHPPP interaction networks, underlying the structural integration

of the binding pocket. Twelve residues are consistently involved in DHPPP binding across all eight systems: Asn396 ( $\beta$ 1), Ser435, Ser/Ala436, Ala/Gly437 (D2), Asp482 ( $\beta$ 3), Asn502 ( $\beta$ 4), Val527 and Met529 ( $\beta$ 5), Asp575 ( $\beta$ 6), Gly605 and Lys609 (D7) and Arg686 ( $\beta$ 8). This interaction network forms an extensive and stable binding pocket, effectively anchoring DHPPP in the catalytic site. Among these, Lys609 (loop D7) appears to be a key residue as it interacts with both *p*ABA and DHPPP in all systems, suggesting its central role in ligand coordination. Conversely, residues Asn398 and Ser403 (loop D1), and His688 (loop D8) are unique to the *vagKgs* system, suggesting a variant-specific arrangement of the binding environment (Figure 5B).

**Table 3.** Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and the nitrogen atom of *p*-aminobenzoic acid, measured throughout the 200 ns molecular dynamics simulations for each system.

	Average (Å)	Std. Dev. (Å)
WT	3.64	0.32
ISgKAA	3.83	0.44
IagKAA	3.60	0.30
vSAKAA	3.82	0.77
vagKAA	3.45	0.28
vagKgs	3.43	0.25
ISgegA	3.84	0.47
vagegs	3.45	0.24



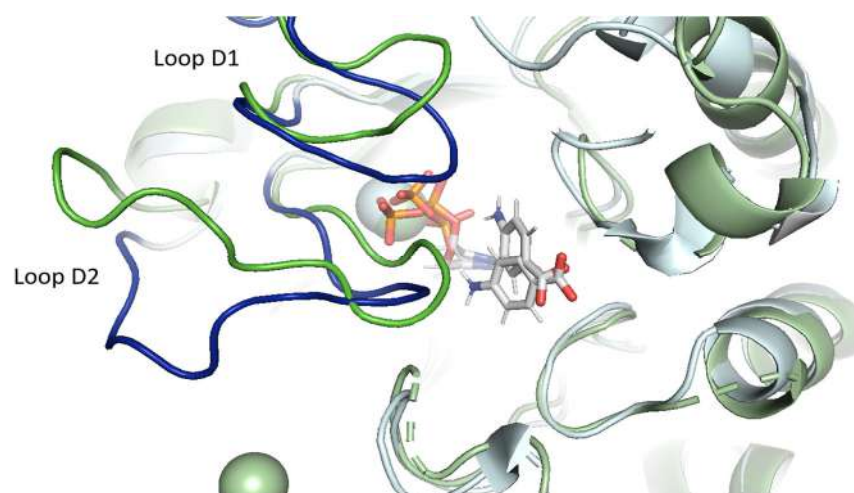
**Figure 5.** Residues involved in the interaction with DHPPP in (A) the wild-type (WT) system and (B) the *vagKgs* variant with natural ligands. DHPPP is shown in blue.

Finally, we note that residues of inserts N3 and D7, which exhibit significant conformational flexibility according to the RMSF, do not contribute to the binding of the two natural ligands (DHPPP and *p*ABA), further confirming their peripheral role in substrate recognition.

#### 2.4. Structural Reorganization of the Active Site in the Case of *vagKgs* Mutant

In the *vagKgs* mutant, a substantial reorganization of the active site is observed, compared to the WT enzyme (Figure 6). This structural rearrangement is primarily associated with conformational changes in the D1 and D2 loops. Indeed, four additional residues, Asn398, Ser403, Asp482 and His 688, are positioned in the vicinity of DHPPP and form stabilizing hydrogen bonds (Figure 5B). We note that the conformations adopted by the D1 and D2 loops in the *vagKgs* system differ not only from the WT, but also from all the other

systems studied, highlighting a unique architecture in this mutant. This reorganization may have functional implications for ligand binding and catalysis.



**Figure 6.** Conformation of D1 and D2 loops after clustering for *Pf*DHPS wild-type (green) and *vagKgs* mutant (blue). Structural alignment was performed in PyMOL using the *align* command, which performs sequence alignment and superimposes the  $\alpha$ -carbon atoms.

## 2.5. Comparison in Presence of Sulfadoxine

### 2.5.1. Sulfadoxine Instability

The same study was carried out by replacing *p*ABA with SDX. However, the simulation times in the presence of SDX were significantly shortened in all systems, due to early dissociation of the inhibitor from the active site. This rapid unbinding was consistently observed, indicating reduced binding stability compared to the natural ligand. However, in the *vagKgs* system, SDX exhibits a distinct behavior: after leaving its original binding pocket, the inhibitor migrated to a nearby site within the active site and remained stably bound over the rest of the simulation, unlike other systems (Figure S4). In the *vagKgs* system, the removal of SDX from its original binding site does not appear to interfere with the anchoring of *p*ABA in the active site. However, the presence of SDX induces a conformational change in the D2 loop, which adopts an open conformation. The residues interacting with SDX in this alternate position do not differ significantly (as discussed in the following paragraph) and include Phe402 (loop D1), Pro438 and Phe439 (D2), Pro535 (D5), and Val621 and Ile623 (insert D7). The displacement of SDX in the enzyme was monitored by measuring the distance between the atoms C9 of DHPPP and the nitrogen atom of SDX throughout the trajectory (Figure S5).

### 2.5.2. Conformational Variability of Sulfadoxine

Interestingly, we also observe that SDX adopts different conformations throughout the simulations. Analysis of the dihedral angles between the rings of SDX reveals a correlation between its position within the enzyme and its conformational stability. Figures S5 and S6 depict the variations of the C18-S21-N22-C25 dihedral angle, showing that SDX transits among three distinct conformational states: an initial state around  $-20^\circ$ , followed by fluctuations between this state and two alternative states around  $+120^\circ$  and  $-130^\circ$  when SDX leaves the active site. Notably, the *vagKgs* variant shows distinct behavior, with the dihedral angle predominantly stabilized near  $-20^\circ$ , rarely sampling the  $+120^\circ$  conformation. Similarly, the ISgegA system does not explore this  $+120^\circ$  state, but predominantly adopts the  $-130^\circ$  conformation. In order to explore SDX conformational landscape, we performed a scan of the C18-S21-N22-C25 dihedral angle using the semi-empirical tight-

binding method GFN2-xTB [12]. We characterized three local minima very similar to the three states identified in the MD simulations (Figure S7). Thus, the starting conformation does not correspond to the most stable minimum found with GFN2-xTB. This suggests that the enzyme environment imposes conformational constraints that favor suboptimal but structurally accommodated SDX conformers. Such a deviation from the lowest-energy geometry may contribute to reduced binding affinity and premature dissociation observed across systems.

### 2.5.3. Enzyme Stability

As observed with the natural ligands, the total energy of all eight systems complexed with SDX remained stable throughout the 200 ns production phase, ensuring the overall stability of the simulations (Figure S8). The RMSD values, calculated across all residues (Figure S9), with mean values ranging from  $2.68 \pm 0.36$  Å for the vagKAA system to  $3.72 \pm 0.60$  Å for ISgegA (Table 4), indicate overall structural stability.

**Table 4.** Root mean square deviation (RMSD) of the eight *PfDHPS* systems in the presence of the inhibitor (sulfadoxine) during 200 ns of molecular dynamics simulations.

	Average $\pm$ Std. Dev. (Å)
WT	$2.69 \pm 0.36$
ISgKAA	$3.42 \pm 0.38$
IagKAA	$3.18 \pm 0.38$
vSAKAA	$2.96 \pm 0.31$
vagKAA	$2.68 \pm 0.36$
vagKgs	$2.79 \pm 0.39$
ISgegA	$3.72 \pm 0.60$
vagegs	$3.36 \pm 0.59$

A comparison of RMSF profiles of WT *PfDHPS* bound either to the natural ligands (DHPPP and *pABA*) or to the inhibitor (DHPPP and SDX) reveals three notable differences (Figure 3B). In the presence of SDX, the D2 and D5 loops exhibit increased flexibility, while the D7 insert, previously more mobile with *pABA*, is associated with a significant reduction in flexibility. This decreased mobility may be attributed to specific stabilizing interactions between SDX and residues within the insert D7 region, as discussed below. Importantly, this trend is consistent across all eight systems bound to SDX: they exhibit similar RMSF profiles, consistently showing decreased mobility in the D7 insert compared to *pABA* bound systems (Figure 3C). These observations suggest that, although SDX is prone to dissociation, its transient presence may still influence local structural dynamics, not only in the active site but also in the more distant insert D7 region.

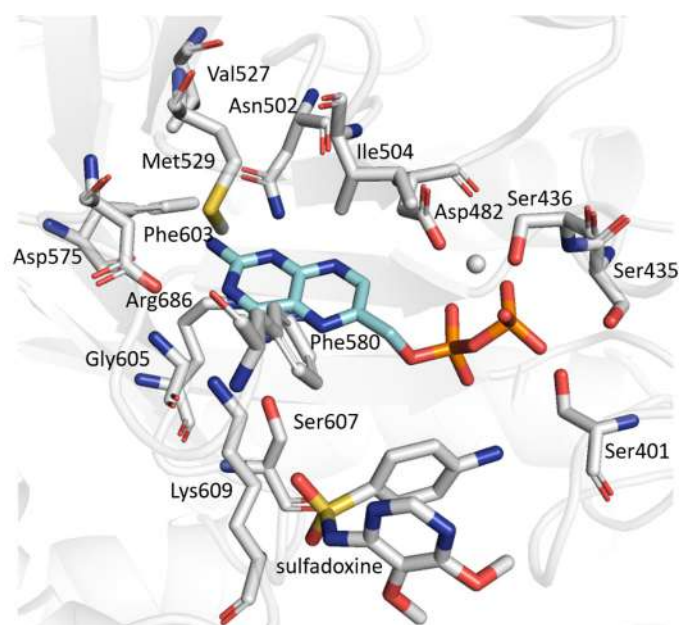
## 2.6. Conformational Analysis of *PfDHPS* Active Site in Complex with Sulfadoxine

### 2.6.1. WT *PfDHPS*

For the WT system, we conducted a detailed analysis of the active site structure and stability in the presence of SDX, focusing on the first 130 ns of the molecular dynamics trajectory. Intermolecular interactions were analyzed using IGMPlot, based on the representative structure from the main cluster as a reference. We also performed a native contact analysis throughout the trajectories to confirm the persistence of key interactions identified with IGMPlot.

The residues involved in DHPPP binding are mostly conserved whether the *PfDHPS* is complexed with the natural ligand *pABA* or the inhibitor SDX (Table S4, Figure 7). One notable difference is the presence of Glu434, which is only involved in the *pABA*-bound system. Conversely, residues Ile394, Phe402 and Gly605 are only involved in the presence

of SDX. We conclude that the interaction with the natural ligand (*p*ABA) or the inhibitor (SDX) does not alter the DHPPP/DHPS interaction network.



**Figure 7.** Residues involved in the interaction with DHPPP in the wild-type *Pf*DHPS bound to sulfadoxine.

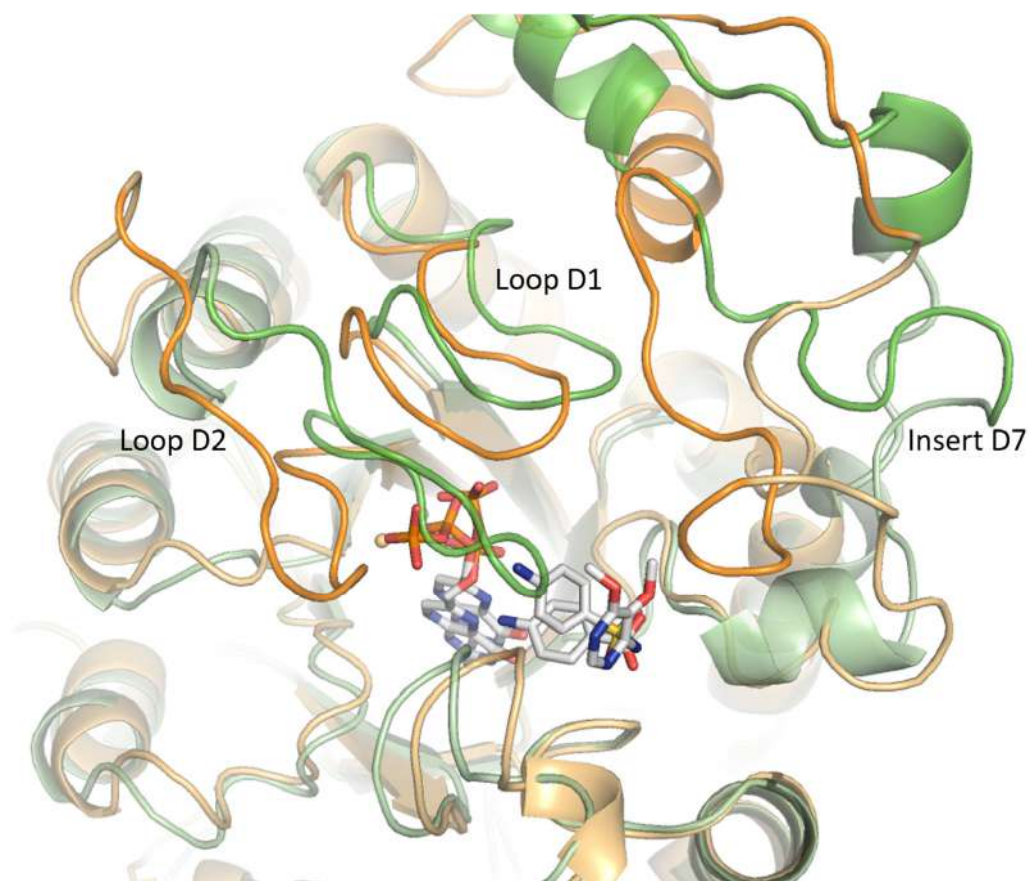
Native contact analysis reveals that six key residues in the WT enzyme maintain stable interactions with SDX for more than 50% of the simulation time (Table S5). These residues are located on loops D1 (Phe402), D5 (Pro535 and Met538), D6 (Phe580), and D7 (Lys609 and Arg610). IGMPLOT analysis of the representative cluster frame further identifies transient interactions involving the residue Gly579 (loop D6), as well as Val622 and Asn624, from the N-terminal region of the D7 insert. Residues Val622 and Asn624 interact with SDX for 27% and 23% of the simulation time, respectively. Due to the structural similarity of the aminobenzene moiety in *p*ABA and SDX, the interaction profiles of both ligands within the WT systems are largely conserved (Table S5). The main difference lies in the loss of interactions involving D2 loop residues in the presence of SDX (Figure 8). Loops D1 and D2 display marked conformational flexibility, adopting distinct conformations depending on the bound ligand. Specifically, the D2 loop closes in the presence of the natural ligands (DHPPP and *p*ABA) but shifts to an open conformation upon SDX binding. This rearrangement likely underlies the reduced binding stability and premature dissociation of the inhibitor.

### 2.6.2. *Pf*DHPS Mutants

We conducted a detailed analysis of SDX interactions in mutated *Pf*DHPS where SDX remained in its original binding site for over 50 ns. The systems studied include ISgKAA, IagKAA, vagKAA and vagKgs. IGMPLOT data and native contact analysis reveals that key residues—Phe580 (in loop D6), Lys609 and Arg610 (both in loop D7)—consistently interact with SDX across all four systems (Figure S10 and Table S6). The IagKAA system shows the most frequent interactions. Unlike the WT system, loop D2 also contributes to the SDX binding pocket in all the four systems, with the involvement of residues 436, 437 and/or 438.

Binding free energies for SDX were calculated only for mutated *Pf*DHPS systems in which SDX remained in the binding pocket for at least 50 ns (which excludes vSAKAA, ISgegA and vagegs). Although this sampling window is shorter than the one used for *p*ABA, extending the analysis beyond the dissociation event would not be meaningful.

In this context, the 50 ns window provides the most consistent and informative estimate of the bound state. However, it should also be emphasized that MM/GBSA results are highly dependent on the quality of conformational sampling, and longer trajectories would provide more reliable estimates of binding free energy. A 50 ns sampling window is short and does not allow for an accurate estimation of equilibrium properties. The higher standard deviations observed compared to the *p*ABA systems reflect this more limited sampling and do not allow us to conclude about a gain or loss of stability (Table 5).



**Figure 8.** Conformations of the D1 and D2 loops, and the D7 insert, after clustering for *Pf*DHPS WT bound. to *p*ABA (green) and sulfadoxine (orange). Structural alignment was performed in PyMOL (version 2.5.2) using the *align* command, which combines sequence alignment with superposition of  $\alpha$ -carbon atoms.

**Table 5.** Binding free energies of SDX calculated using Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) method. For each system, 28,000 snapshots from the first 50 ns of the molecular dynamics trajectory were used for the calculation.

	Average (kcal/mol)	Std. Dev. (kcal/mol)
WT	−19.06	3.56
ISgKAA	−16.67	5.58
IagKAA	−20.24	4.45
vagKAA	−17.94	5.80
vagKgs	−18.92	4.03

### 3. Discussion

The crystal structure of *Pf*DHPS was only resolved recently and still contains several unresolved regions, particularly within the parasite-specific inserts [3]. Earlier simulation

studies were based on homology models that excluded two [8] or one [9] of these inserts. Residues 612–670, absent from the crystal structure 6JWQ, were extracted from a homology model. However, the confidence level for this region was low, as indicated by a QMEAN score of 0.567 [13]. Molecular dynamics simulations reported by Boateng et al. [14], using PDB ID 6JWX [3], showed RMSF profiles for SDX-bound *Pf*DHPS broadly consistent with our results. However, a key difference emerges in the flexibility of this insert in the absence of inhibitor. In our simulations, this region displays markedly greater mobility in the *p*ABA-bound state, suggesting a ligand-induced conformational response. This observation also supports the hypothesis that insert D7 can be considered structurally independent from the enzyme core, particularly in the monomeric form used in our simulations. Several studies have indicated that parasite-specific inserts are implicated in the function and structural stabilization of *P. falciparum* bifunctional enzymes, including *Pf*HPPK-DHPS [15]. Our findings are consistent with these reports, indicating that while these inserts do not directly interact with the natural substrates (DHPPP or *p*ABA), they may play structural or regulatory roles. A more detailed structural and functional characterization of this insert would be valuable for understanding its contribution to enzyme architecture and drug resistance mechanisms.

Excluding insert D7, RMSF analyses reveal no significant differences in overall *Pf*DHPS stability across mutant systems. As expected, the introduced mutations do not compromise global enzyme integrity, which is a prerequisite for catalytic function, and by extension, for parasite viability. This also applies to the *vagegs* system, which, although not yet reported in field studies, cannot be excluded as a potential future variant. This study does not preclude the possible emergence of this allele under selective pressure. However, while the enzyme remains globally stable, local rearrangements within the active site can be substantial, as exemplified by the *vagKgs* mutant.

A conformational analysis of the *Pf*DHPS active site across WT and mutant systems bound to *p*ABA reveal both conserved and divergent features influencing ligand stability. In the WT and four variants (ISgKAA, IagKAA, *vag*KAA, *vagegs*), the *p*ABA binding pocket remains largely intact, relying on key residues from loops D2, D5, D6, and D7, highlighting the critical role of D2 loop contacts in maintaining ligand binding. The only exception is ISgKAA, the only variant where residue 437 is mutated while 436 remains unchanged. The conservation of this binding pocket in multiple mutants indicates a degree of structural resilience in *p*ABA recognition when D2 loop contacts are maintained.

In contrast, the ISgegA system shows a disrupted binding pocket: the D2 loop does not participate in ligand stabilization, and the interaction network is limited to five residues, correlating with the increased D2 loop flexibility and lower *p*ABA binding affinity. These findings underscore the functional importance of the D2 loop in stabilizing substrate binding and suggest that its disruption may be a key mechanism in resistance.

Two other mutants, *vSAKAA* and *vagKgs*, show a restructured binding pocket that incorporates loop D1, suggesting a compensatory rearrangement allowing loop D1 to support ligand stabilization when D2 contacts are weakened.

Our results also suggest that specific combinations of mutations, particularly S436A, A437G, and I431V, may enhance the catalytic efficiency of *Pf*DHPS by promoting a more favorable positioning of *p*ABA relative to DHPPP. The reduced distance between the reactive atoms could facilitate covalent bond formation, which is a critical step in the catalytic mechanism. Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) calculations should be conducted to test this hypothesis by comparing the energy barriers.

Altogether, these observations highlight the structural plasticity of the *p*ABA binding pocket and its capacity to adapt to mutations through alternative stabilizing interactions. The D2 loop emerges as a central determinant of ligand affinity, with its involvement—or

lack of involvement—strongly influencing binding strength. Additionally, the integration of loop D1 into the binding pocket in specific mutants underscores the enzyme conformational adaptability, with implications for resistance evolution and inhibitor design.

These results can be related to the dynamic behavior of loops D1 and D2, which adopt distinct conformational states depending on the bound ligand. Specifically, while the D2 loop tends to adopt a closed conformation around natural substrates (DHPPP and *p*ABA), it shifts toward an open conformation in the presence of SDX. This observation is consistent with the previous structural study reported by Chitnumsub et al. [3].

In this case, we have also highlighted the marked instability of SDX across all systems, particularly in mutants. Boateng et al. [14] previously reported that, in ISAKgA, ISAKAs and ISgKgs mutants, SDX tends to dissociate from the active site or migrate toward an adjacent binding pocket, while remaining stable in the WT system over 150 ns. In contrast, our extended 200 ns simulations reveal that even in the WT system, SDX dissociates after 130 ns, suggesting that mutations not only reduce SDX binding stability but may also compromise its inhibitory efficacy, potentially contributing to resistance mechanism.

We conclude that the ligand-induced D2 loop opening likely contributes to the premature unbinding of SDX observed in our simulations. The native contact analysis confirms this trend: while *p*ABA relies on an extensive network as described above, SDX binding is more localized, and often restricted to a subset of residues on D6 and D7. Moreover, the dihedral angle analysis of SDX reveals conformational variability that may further hinder its stable accommodation in the binding pocket. From a drug design perspective, this highlights a key limitation of SDX: its structural flexibility and sensitivity to the active site environment may limit its effectiveness against *Pf*DHPS variants. Future antifolate inhibitors could benefit from conformational preorganization, locking key torsional angles into bioactive geometries, to improve affinity and specificity, even in the presence of resistance-associated mutations.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Molecular Structures

The initial structure of the WT *Pf*DHPS protein (residues from Ile 366 to Asp 708) was extracted from the Protein Data Bank (PDB) entry 6JWQ [3]. To complete the missing parts, the positions of residues 397–410, 436–445 and 612–670 were extracted from the PDB entries 5Z79 (*Plasmodium vivax*) [16], 6JWR (*Plasmodium falciparum*) and from a homology model, respectively [13]. The PDB entry 5Z79 from *P. vivax* HPPK-DHPS was used for sequence conservation, but residues 407 (leucine 407 with isoleucine) and 410 (aspartic acid 410 with glutamine) were modified in accordance with the *Pf*DHPS WT sequence (Figure S11).

The obtained structure was compared with the AlphaFold2 prediction (version 2.2.0) [10]. All structure alignments were performed using PyMOL (version 2.5.2) [17] and the align command, which conducts both sequence alignment and structural superposition of the  $\alpha$ -carbon atoms.

### 4.2. System Preparation

A total of seven mutants was generated from the WT *Pf*DHPS structure obtained after MD production, using the AMBER package (version 16) [18], incorporating the following substitutions: isoleucine 431 to valine (Ile431Val), serine 436 to alanine (Ser436Ala), alanine 437 to glycine (Ala437Gly), Lysine 540 to glutamine (Lys540Glu), alanine 581 to glycine (Ala581Gly), and alanine 613 to serine (Ala613Ser) as described in the Supplementary Table S1. Five alleles were selected on the basis of epidemiological data (ISgKAA, IagKAA, vagKAA, vagKgs, ISgegA). The latter two alleles were not found in epidemiological studies: the isolated Ile431Val mutation (vSAKAA) and a combination of all six mutations (vagegs).

To date, the combination of these six mutations has not been reported in epidemiological studies. Investigating these alleles will provide insights into why they have not been observed in the field and whether they might emerge in the future.

DHPPP and *p*ABA structures were extracted from the PDB entry 6JWR. SDX structure was obtained from PDB entry 6JWX. A  $Mg^{2+}$  cofactor coordinates the diphosphate group within DHPPP.

#### 4.3. Molecular Dynamics Simulations

All MD simulations were performed with the AMBER package, using the ff14SB force-field [19].

Ligand parameters were generated using the General Amber Force Field (GAFF) [20] and prepared with the Antechamber programs [21]. The Leap module was used to prepare the PfDHPS/ligand complexes.

All the systems were solvated in a cubic box with a minimal distance of 8.0 Å between the protein and the box edge, using the TIP3P water model [22]. The total charge of the system was neutralized with  $Cl^{-}$  ions.

For each complex, an energy minimization was first performed with a 20 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>2</sup> constraint applied to the solute. A second minimization without restraint was then performed on the whole system. Subsequently, the entire system was heated from 100 to 300 K during 500 ps using a 2 fs time step and a Langevin thermostat with a collision frequency of 2 ps<sup>-1</sup> at constant volume. The restraints initially applied on the complex were slowly released during the equilibration process, run for 500 ps at constant pressure to allow the system density to be stabilized, with 1 atm target pressure using the Berendsen barostat with a pressure relaxation time of 2 ps. Finally, the production setup was implemented in the NVT ensemble (i.e., the number of particles *N*, the volume *V*, and the temperature *T* of the system are kept constant). Long-range electrostatic interactions were treated using the particle–mesh Ewald method with an 8.0 Å cutoff, while covalent bonds involving hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm with a 2 fs integration time step.

MD simulations were performed for a total of 200 ns to ensure sufficient sampling of the protein–ligand complex, allowing for the accurate exploration of conformational changes, dynamic interactions and the evaluation of ligand stability within the binding site. Structural coordinates were written after every 2 ps, resulting in a total of 100,000 frames. Analyses of root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuations (RMSF), distances and hydrogen bonds were performed using the AMBER module CPPTRAJ [23]. The Visual Molecular Dynamics (VMD) software (version 1.9.4a53) was used to visualize the trajectories [24].

Mutated systems were prepared after 10 ns of WT system production and extraction of the cluster most representative structure.

#### 4.4. MD Trajectory Analysis

The binding free energies were calculated using molecular mechanics with generalized Born surface area (MM/GBSA) [25]. For each system, 98,000 snapshots of the last 198 ns were used on the MD trajectory.

MD simulations analysis (root mean square deviation (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF)) were performed using the CPPTRAJ utility of AMBER [23].

The clustering was performed on each trajectory to extract significant structures as starting points for the active site characterization using the density-based spatial clustering of applications with noise method (DBSCAN), with 25 as the minimum number

of points required to form a cluster and a distance threshold of 0.9 Å between points to form a cluster [26].

To confirm intramolecular interactions between *Pf*DHPS and ligands during MD simulations, the nativecontacts function from the CPPTRAJ utility of AMBER was used, with a maximum distance of 4.0 Å [23]. Only interactions present in more than 50% of frames were retained.

#### 4.5. IGMPlot

IGMPlot with a grid increment of 0.05 Å in each direction was used to assess intramolecular interactions between *Pf*DHPS and ligands [11].

## 5. Conclusions

This study provides a comprehensive view of *Pf*DHPS dynamics and its interactions with both natural ligands and SDX, across WT and resistance-associated mutants. Using molecular dynamics simulations, we show that while the global structural stability of *Pf*DHPS is maintained despite mutations, local conformational changes, particularly involving loop D2, deeply affect ligand binding.

The D2 loop emerges as a central determinant of ligand affinity. Among all the systems that exhibit their own specificities, we highlighted the distinctive case of the *vagKgs* mutant, in which the compensatory recruitment of loop D1 contributes to enhancing the natural ligand stabilization. In contrast, SDX consistently fails to engage D2 residues and displays increased conformational variability, leading to early unbinding events and reduced interaction networks, especially in the mutant systems.

Our findings reinforce the critical role of structural plasticity in resistance evolution and highlight specific regions as strategic targets for inhibitor design. Mimicking the natural binding mode of *pABA*, especially its interaction with loop D2, or exploiting stabilizing contacts within more conserved structural regions may offer a path toward designing new antifolates that remain effective against resistant strains.

Altogether, this study not only explores the molecular basis of SDX resistance in *Pf*DHPS but also emphasizes the delicate interplay between active site accommodation upon mutations, ligand selectivity, and catalytic efficiency. In this regard, this study paves the way to further investigation into the catalytic activity of *Pf*DHPS. This study is currently under investigation within our team in order to assess how mutations impact enzymatic activity, using hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical calculations.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules30204118/s1>, Figure S1: Structure of Wild-Type *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase; Figure S2: Total energy profiles for the eight *Pf*DHPS systems bound to their natural ligands; Figure S3: RMSD profiles of all *Pf*DHPS residues and of residues excluding the insert D7; Figure S4: Position of Sulfadoxine after unbinding; Figure S5: Distance between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen atom of Sulfadoxine; Figure S6: Dihedral angle between atoms C18-S21-N22-C25 of Sulfadoxine; Figure S7: Energy profile for the scan of the C18-S21-N22-C25 dihedral angle in Sulfadoxine; Figure S8: Total energy profiles of the eight *Pf*DHPS systems in the presence of Sulfadoxine; Figure S9: RMSD profiles of all *Pf*DHPS residues across the eight systems in the presence of Sulfadoxine; Figure S10: Residues involved in the interaction with Sulfadoxine for *Pf*DHPS variants; Figure S11: Description of *Pf*DHPS structure building; Table S1: List of the studied systems with the corresponding mutations of interest; Table S2: Residues involved in the *pABA* pocket; Table S3: Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with DHPPP in systems with natural ligands; Table S4: Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with DHPPP in the WT systems; Table S5: Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with *pABA* or Sulfadoxine in the WT systems; Table S6: Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with Sulfadoxine.

**Author Contributions:** Conceptualization and project administration: M.B.; Methodology: A.B., G.L. and M.B.; Molecular dynamic simulations: E.G.; Data Analysis: E.G., M.B., S.M. and N.J.; Draft preparation: E.G. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The work has been supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-24-CE35-2805 SULPAR).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank the CALMIP mesocenter, where the simulations were performed using HPC resources (grant P1237).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

DHFR	dihydrofolate reductase
DHP	7,8-dihydropteroate
DHPPP	6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate
DHPS	dihydropteroate synthase
HPPK	6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase
MD	molecular dynamics
<i>p</i> ABA	<i>p</i> -aminobenzoic acid
PDB	protein data bank
SP	sulfadoxine–pyrimethamine
SDX	sulfadoxine

## References

1. WHO World Malaria Report 2024. Available online: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024> (accessed on 25 July 2025).
2. Kasekarn, W.; Sirawaraporn, R.; Chahomchuen, T.; Cowman, A.F.; Sirawaraporn, W. Molecular Characterization of Bifunctional Hydroxymethyldihydropterin Pyrophosphokinase-Dihydropteroate Synthase from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *137*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chitnumsub, P.; Jaruwat, A.; Talawanich, Y.; Noytanom, K.; Liwnaree, B.; Poen, S.; Yuthavong, Y. The Structure of *Plasmodium falciparum* Hydroxymethyldihydropterin Pyrophosphokinase-Dihydropteroate Synthase Reveals the Basis of Sulfa Resistance. *FEBS J.* **2020**, *287*, 3273–3297. [[CrossRef](#)]
4. Sutherland, C.J.; Fifer, H.; Pearce, R.J.; bin Reza, F.; Nicholas, M.; Haustein, T.; Njimgye-Tekumafor, N.E.; Doherty, J.F.; Gothard, P.; Polley, S.D.; et al. Novel Pfdhps Haplotypes Among Imported Cases of *Plasmodium falciparum* Malaria in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3405–3410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chauvin, P.; Menard, S.; Iriart, X.; Nsango, S.E.; Tchioffo, M.T.; Abate, L.; Awono-Ambéné, P.H.; Morlais, I.; Berry, A. Prevalence of *Plasmodium falciparum* Parasites Resistant to Sulfadoxine/Pyrimethamine in Pregnant Women in Yaoundé, Cameroon: Emergence of Highly Resistant Pfdhfr/Pfdhps Alleles. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2566–2571. [[CrossRef](#)]
6. Guémas, E.; Coppée, R.; Ménard, S.; du Manoir, M.; Nsango, S.; Mvumbi, D.M.; Nakoune, E.; Moukoko, C.E.E.; Akotet, M.K.B.; Mirabeau, T.Y.; et al. Evolution and Spread of *Plasmodium falciparum* Mutations Associated with Resistance to Sulfadoxine–Pyrimethamine in Central Africa: A Cross-Sectional Study. *Lancet Microbe* **2023**, *4*, e983–e993. [[CrossRef](#)]
7. Naidoo, I.; Roper, C. Mapping “Partially Resistant”, “Fully Resistant”, and “super Resistant” Malaria. *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 505–515. [[CrossRef](#)]
8. Korsinczyk, M.; Fischer, K.; Chen, N.; Baker, J.; Rieckmann, K.; Cheng, Q. Sulfadoxine Resistance in *Plasmodium vivax* Is Associated with a Specific Amino Acid in Dihydropteroate Synthase at the Putative Sulfadoxine-Binding Site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2214–2222. [[CrossRef](#)]

9. de Beer, T.A.P.; Louw, A.I.; Joubert, F. Elucidation of Sulfadoxine Resistance with Structural Models of the Bifunctional *Plasmodium falciparum* Dihydropterin Pyrophosphokinase-Dihydropteroate Synthase. *Bioorg Med. Chem.* **2006**, *14*, 4433–4443. [[CrossRef](#)]
10. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lefebvre, C.; Klein, J.; Khartabil, H.; Boisson, J.-C.; Hénon, E. IGMPlot: A Program to Identify, Characterize, and Quantify Molecular Interactions. *J. Comput. Chem.* **2023**, *44*, 1750–1766. [[CrossRef](#)]
12. Bannwarth, C.; Ehlert, S.; Grimme, S. GFN2-xTB-An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 1652–1671. [[CrossRef](#)]
13. Oguike, M.C.; Falade, C.O.; Shu, E.; Enato, I.G.; Watila, I.; Baba, E.S.; Bruce, J.; Webster, J.; Hamade, P.; Meek, S.; et al. Molecular Determinants of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the Regional Emergence of Dhps 431V. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2016**, *6*, 220–229. [[CrossRef](#)]
14. Boateng, R.A.; Myers-Hansen, J.L.; Dolling, N.N.O.; Mensah, B.A.; Brodsky, E.; Mazumder, M.; Ghansah, A. Global Analysis of *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthase Variants Associated with Sulfadoxine Resistance Reveals Variant Distribution and Mechanisms of Resistance: A Computational-Based Study. *Molecules* **2022**, *28*, 145. [[CrossRef](#)]
15. Birkholtz, L.-M.; Wrenger, C.; Joubert, F.; Wells, G.A.; Walter, R.D.; Louw, A.I. Parasite-Specific Inserts in the Bifunctional S-Adenosylmethionine Decarboxylase/Ornithine Decarboxylase of *Plasmodium falciparum* Modulate Catalytic Activities and Domain Interactions. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 439–448. [[CrossRef](#)]
16. Yogavel, M.; Nettleship, J.E.; Sharma, A.; Harlos, K.; Jamwal, A.; Chaturvedi, R.; Sharma, M.; Jain, V.; Chhibber-Goel, J.; Sharma, A. Structure of 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin Pyrophosphokinase-Dihydropteroate Synthase from *Plasmodium vivax* Sheds Light on Drug Resistance. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 14962–14972. [[CrossRef](#)]
17. DeLano, W.L. Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* **2002**, *40*, 82–92.
18. Case, D.A.; Aktulga, H.M.; Belfon, K.; Cerutti, D.S.; Cisneros, G.A.; Cruzeiro, V.W.D.; Forouzes, N.; Giese, T.J.; Götz, A.W.; Gohlke, H.; et al. AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.* **2023**, *63*, 6183–6191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Maier, J.A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696–3713. [[CrossRef](#)]
20. Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Antechamber: An Accessory Software Package for Molecular Mechanical Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *222*, 2001.
22. Mark, P.; Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 9954–9960. [[CrossRef](#)]
23. Roe, D.R.; Cheatham, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095. [[CrossRef](#)]
24. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 449–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ester, M.; Kriegel, H.-P.; Sander, J.; Xu, X. A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise. In Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, Portland, OR, USA, 2–4 August 1996; AAAI Press: Portland, OR, USA, 1996; pp. 226–231.

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

# **Deciphering the Impact of Mutations on *Pf*DHPS Active Site and Sulfadoxine Binding: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations**

**Emilie Guémas** <sup>1,2,3,\*</sup>, **Sandie Ménard** <sup>2</sup>, **Nicolas Jeanne** <sup>1,2</sup>, **Georges Landa** <sup>1</sup>, **Antoine Berry** <sup>2,3</sup>  
and **Marie Brut** <sup>1</sup>

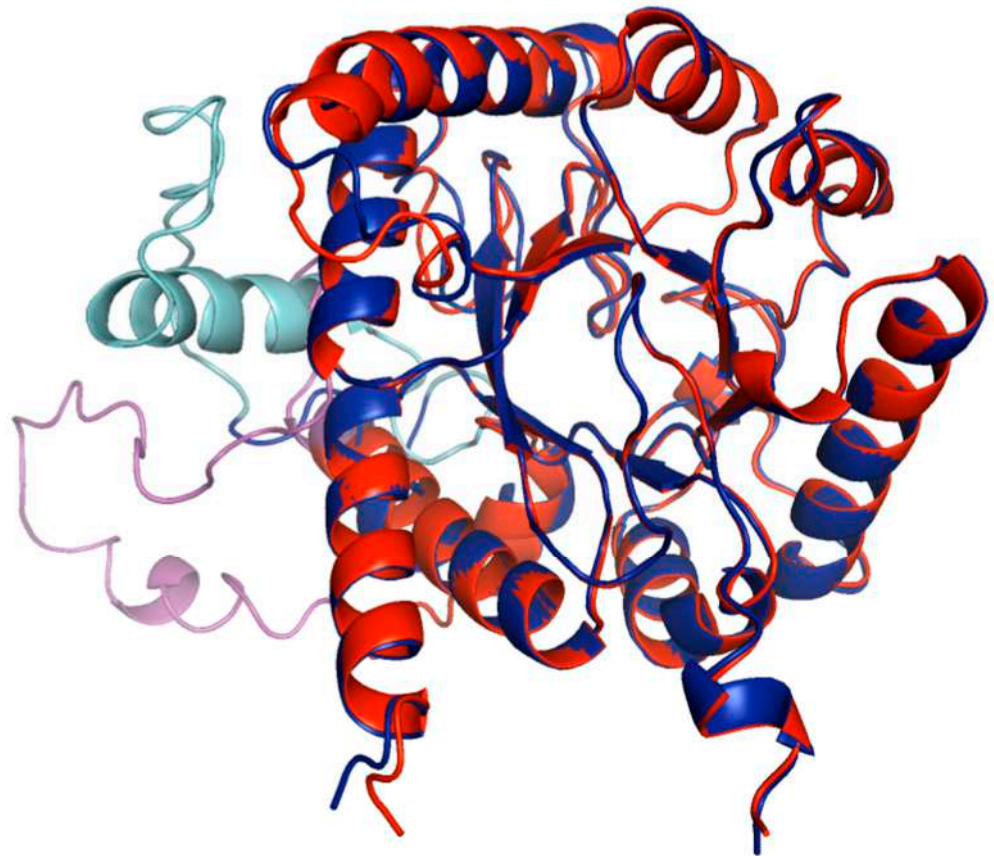
<sup>1</sup> Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS)-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31031 Toulouse, France; [jeanne.n@chu-toulouse.fr](mailto:jeanne.n@chu-toulouse.fr) (N.J.); [georges.landa@laas.fr](mailto:georges.landa@laas.fr) (G.L.); [marie.brut@laas.fr](mailto:marie.brut@laas.fr) (M.B.)

<sup>2</sup> Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, CNRS UMR 5051, INSERM UMR 1291, 31024 Toulouse, France; [sandie.menard@inserm.fr](mailto:sandie.menard@inserm.fr) (S.M.); [berry.a@chu-toulouse.fr](mailto:berry.a@chu-toulouse.fr) (A.B.)

<sup>3</sup> Service de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Toulouse, 31300 Toulouse, France

\* Correspondence: [guemas.e@chu-toulouse.fr](mailto:guemas.e@chu-toulouse.fr)

---



**Figure S1. Structure of Wild-Type *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase.** Wild-type PfDHPS structure was obtained by complementing the incomplete regions of PDB entry 6JWQ with structural data from 5Z79 (*P. vivax*), 6JWR (*P. falciparum*) and a homology model of PfDHPS published by Oguike *et al.* (shown in blue). The resulting model was compared to the Alpha Fold2 prediction (shown in red). Structural differences between the two models (highlighted in cyan and pink) are located within the D7 insert region (residues 620 to 660). Structural alignment was performed using PyMOL *align* command, which combines sequence alignment and superposition of  $\alpha$ -carbon atoms. The alignment yields a root mean square deviation of 0.260 angstroms over 252 aligned residues

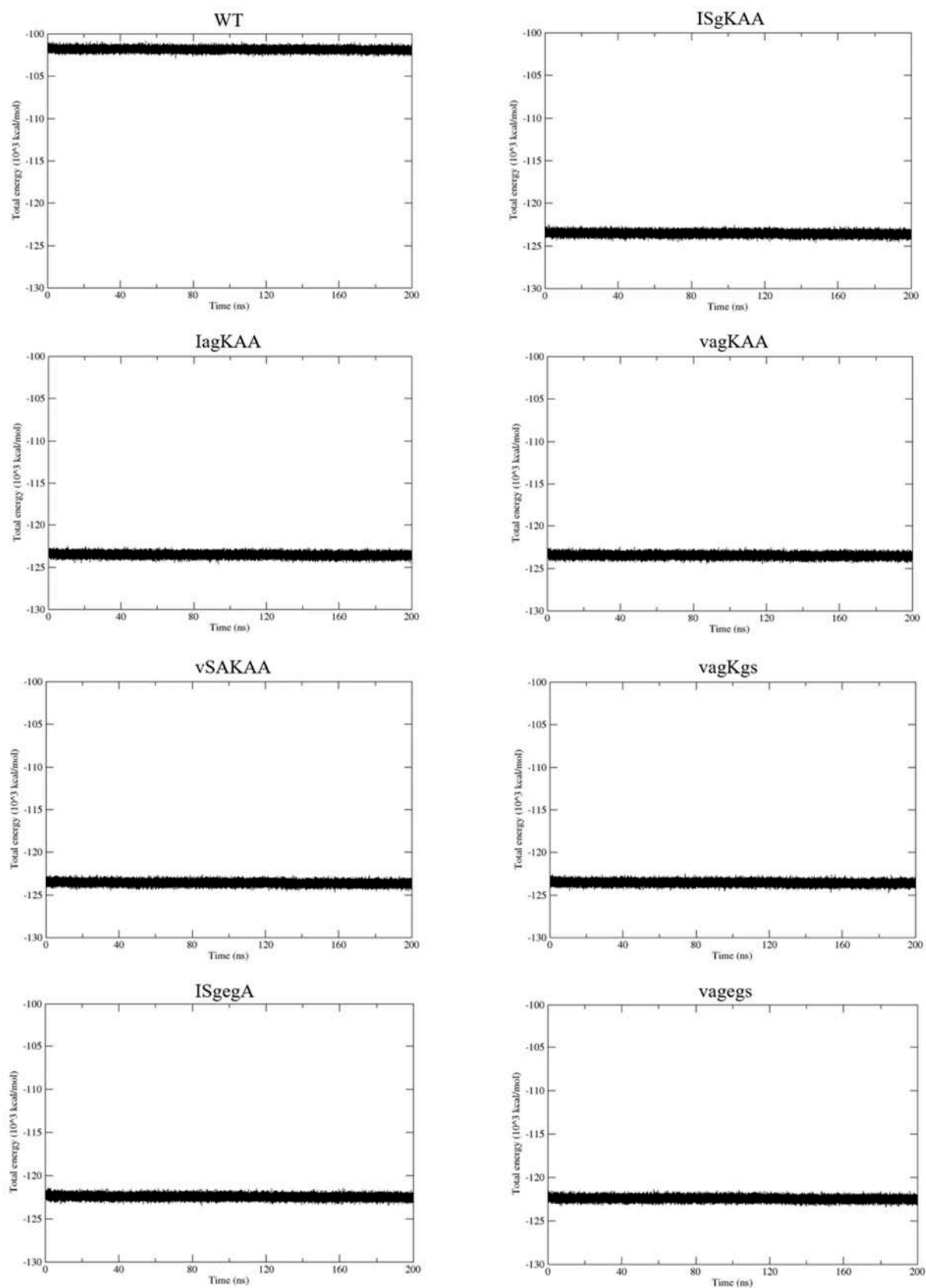


Figure S2. Total energy profiles for the eight *PfdHPS* systems bound to their natural ligands over 200 ns of molecular dynamics simulations.

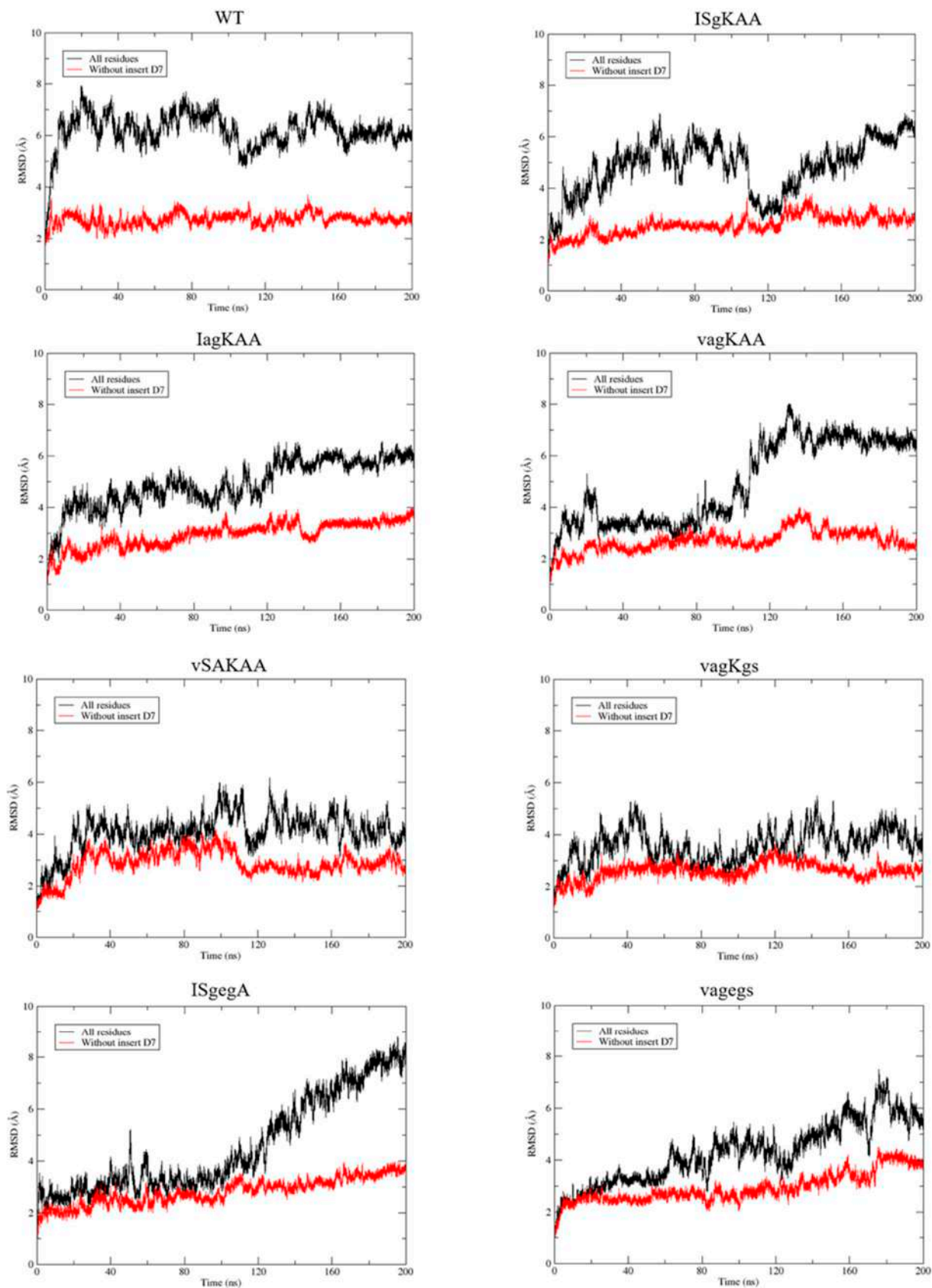
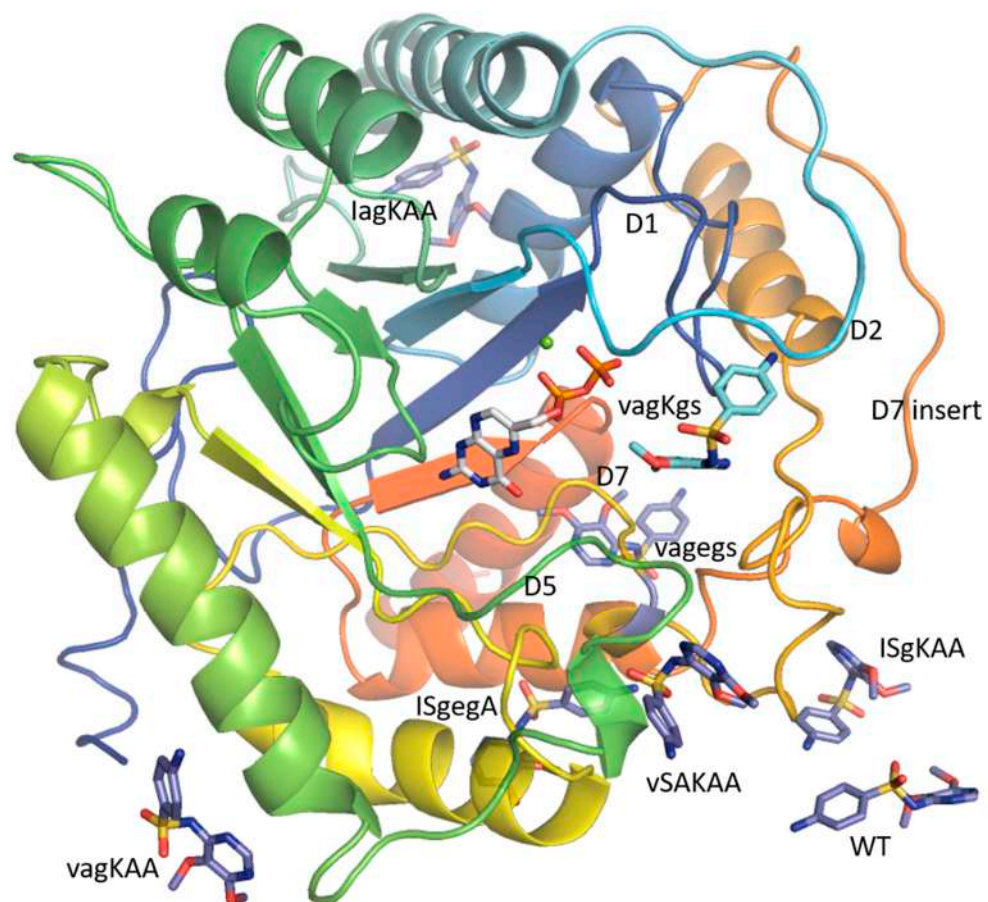


Figure S3. RMSD profiles of all *PfdHPS* residues (black) and of residues excluding the insert D7 (residues 620-660) (red), across eight systems, each bound to its natural ligand, over 200 ns of molecular dynamics simulations



**Figure S4. Position of sulfadoxine after unbinding.** In the *vagKgs* system, the sulfadoxine migrates to a site close to the active site and remains stably bound for the rest of the simulation. The sulfadoxine in the *vagKgs* system is shown in cyan, the others in violet. The system names are shown next to the corresponding sulfadoxine.

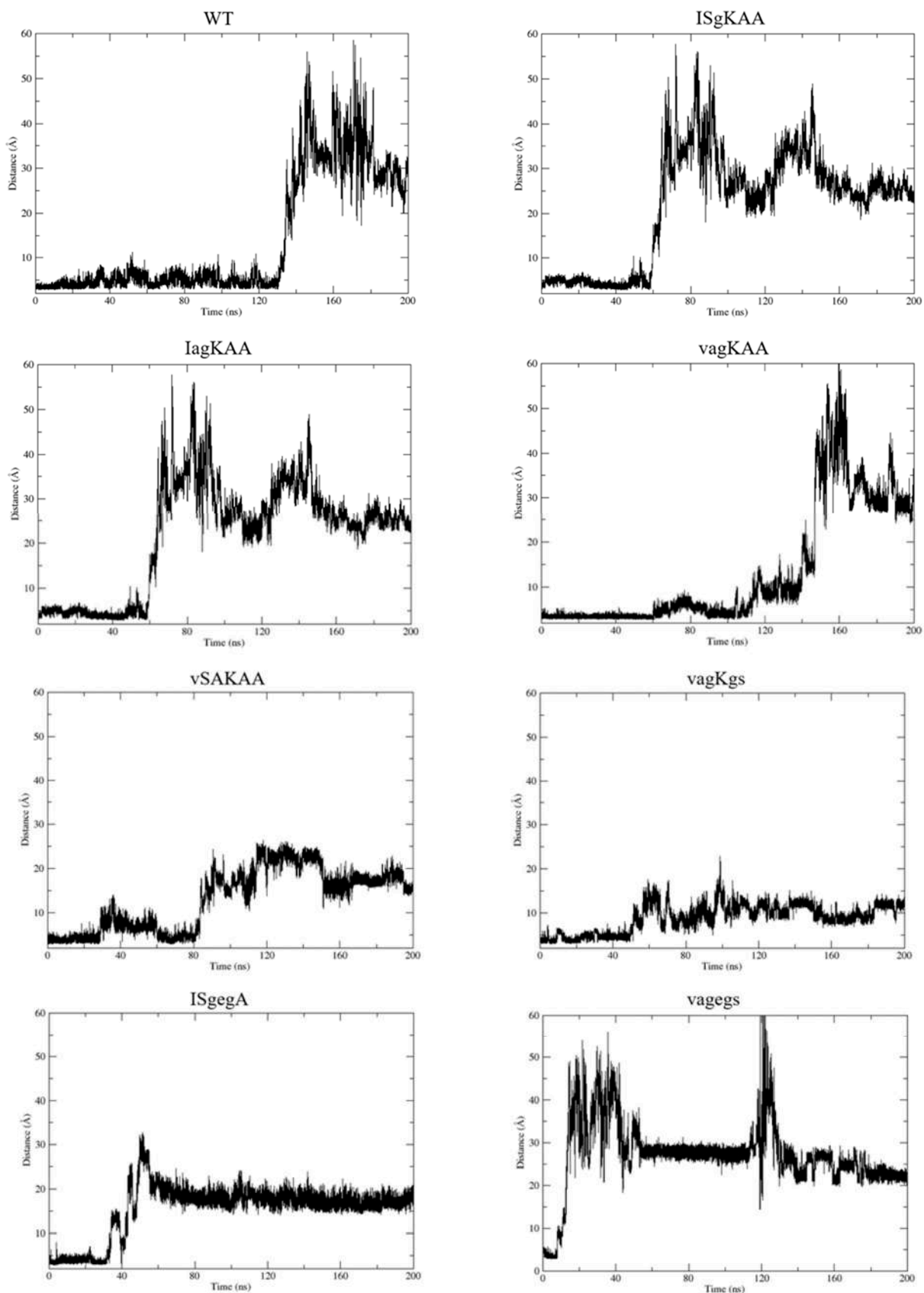
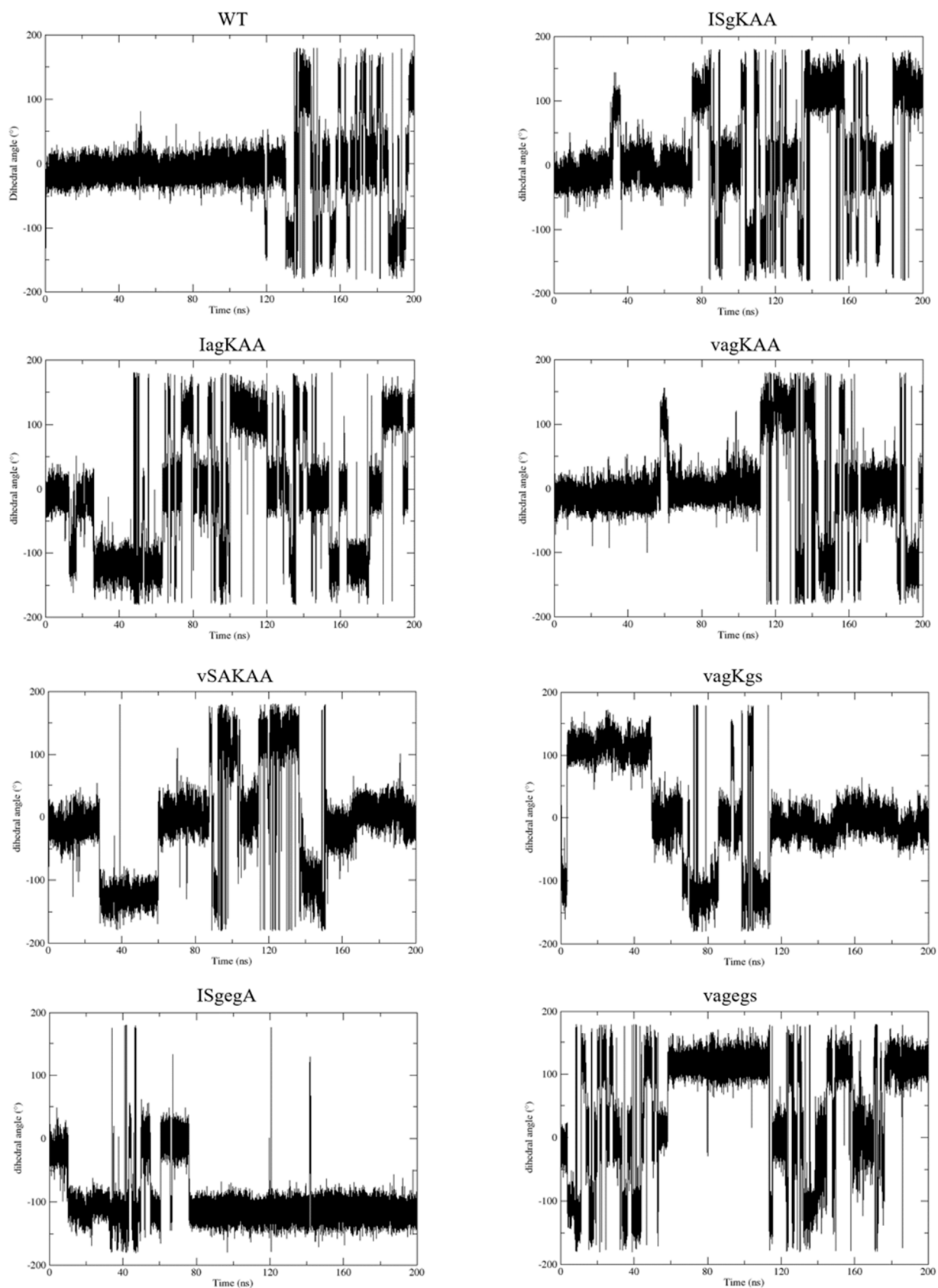
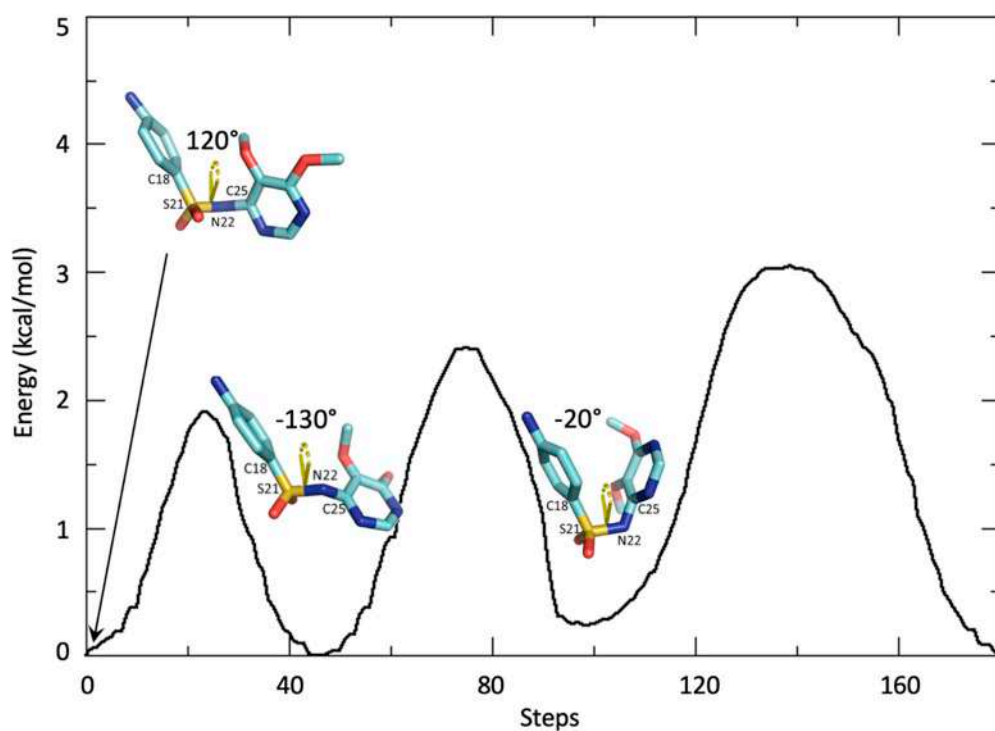


Figure S5. Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) and the nitrogen atom of sulfadoxine, measure across all systems over 200 ns of molecular dynamics simulations.



**Figure S6.** Dihedral angle between atoms C18-S21-N22-C25 of sulfadoxine, measured for each system over 200 ns of molecular dynamics simulations. We identify three different states, with dihedral angle values around  $-120^\circ$ ,  $-20^\circ$  and  $130^\circ$ . This figure should be interpreted alongside Figure S6, as it reveals that conformational changes in sulfadoxine correlate with its dissociation from the active site.



**Figure S7.** Energy profile for the scan of the C18-S21-N22-C25 dihedral angle in sulfadoxine obtained using the semi-empirical tight binding method GFN2-xTB. The geometry of sulfadoxine was first optimized in implicit solvent, and subsequently used as a starting structure for a dihedral scan performed over 360°, with 180 steps. Three energy minima are identified, separated by low energy barriers of approximately 2-3 kcal/mol. These minima correspond well with the conformations observed throughout the trajectories of molecular dynamics.

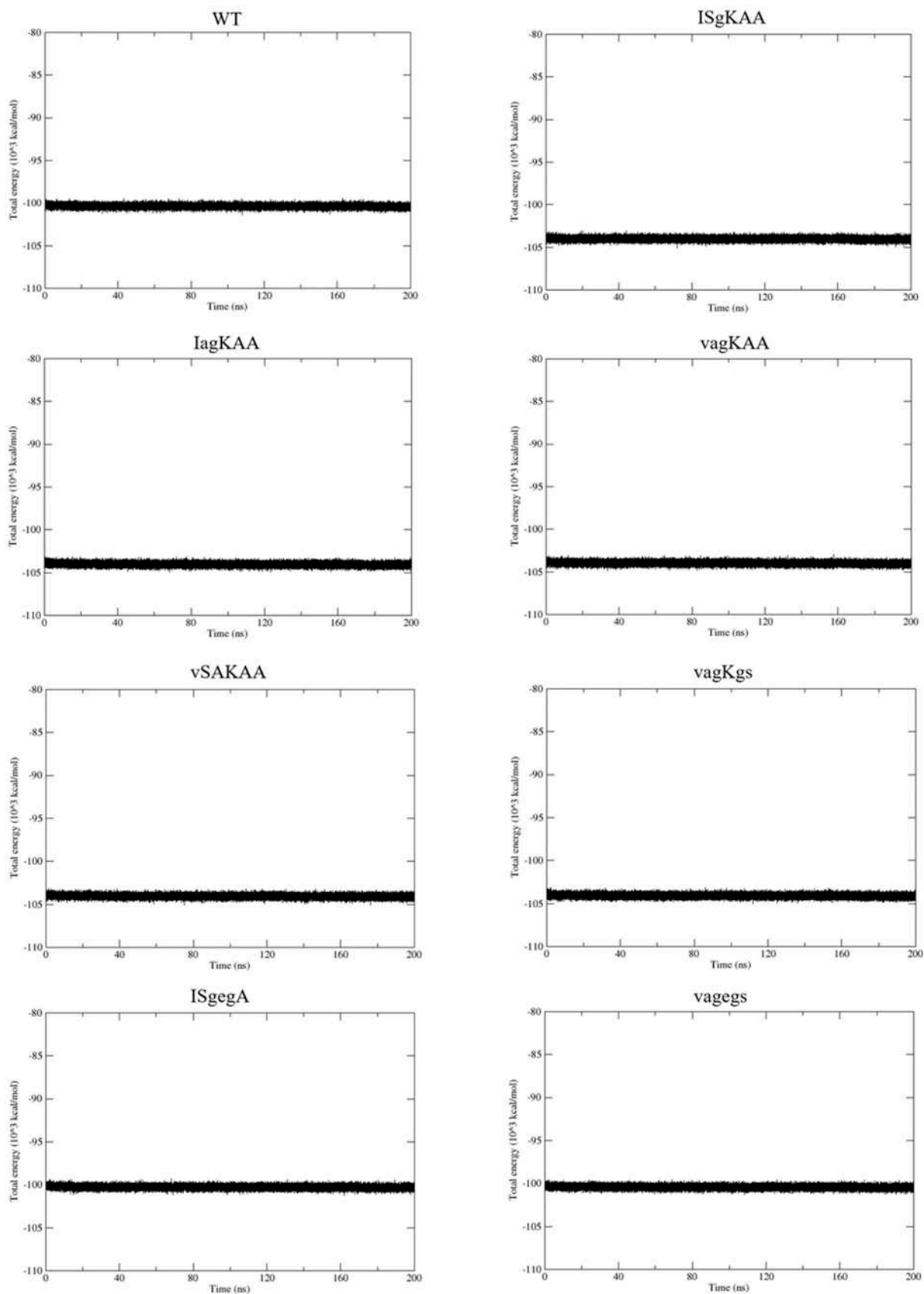


Figure S8. Total energy profiles of the eight *PfDHPS* systems in the presence of sulfadoxine over 200 ns of molecular dynamics simulations.

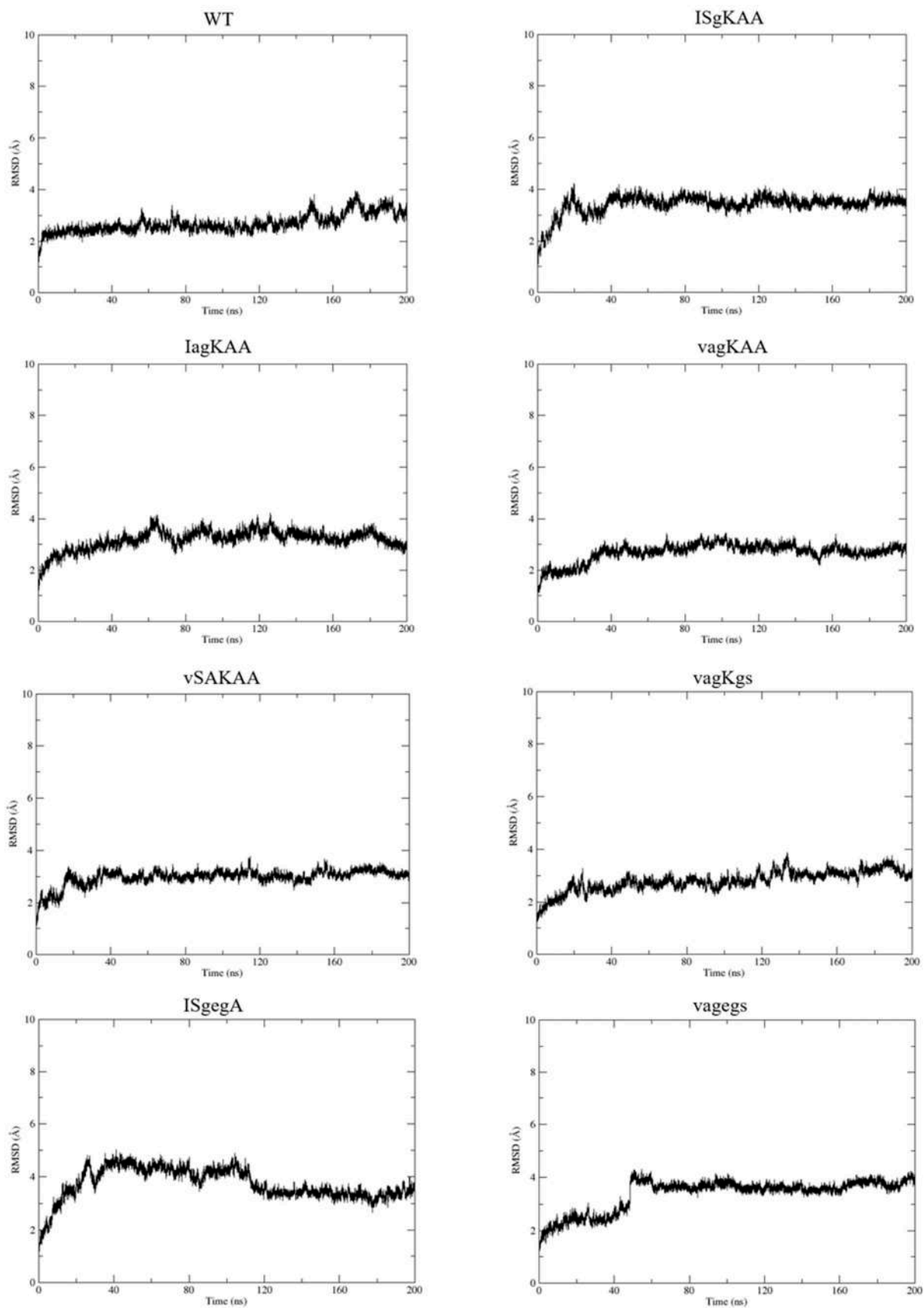
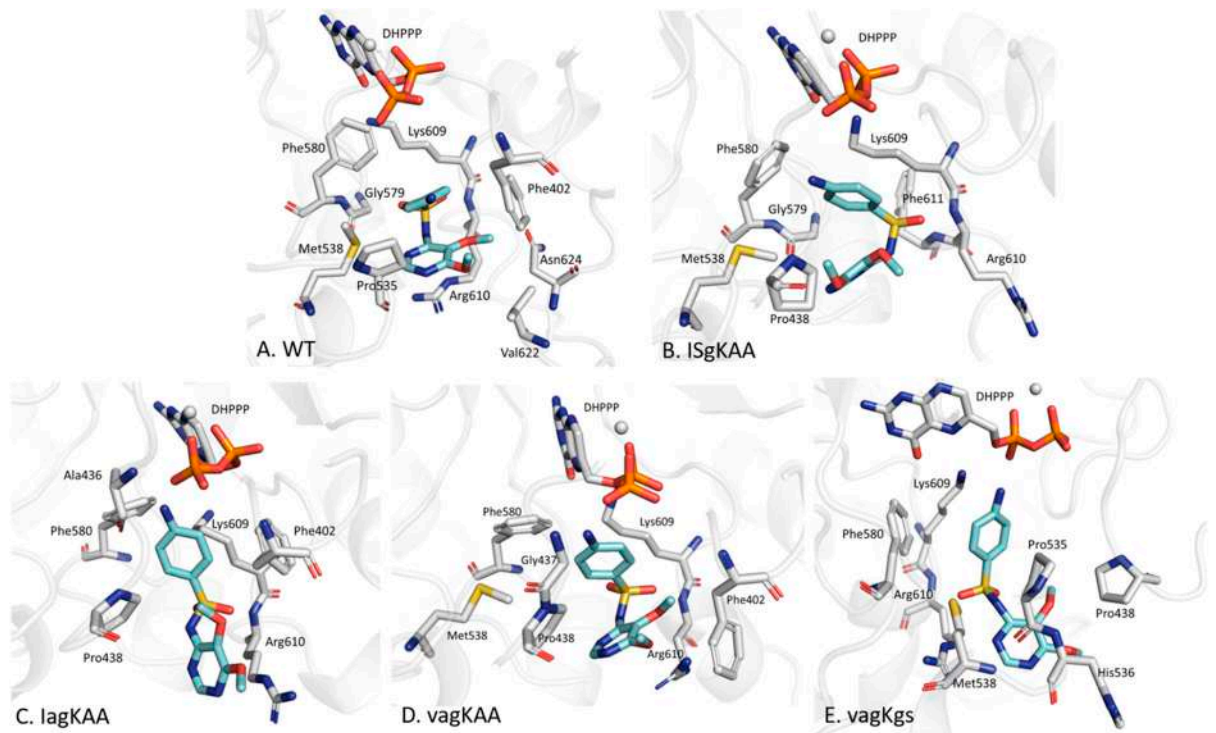
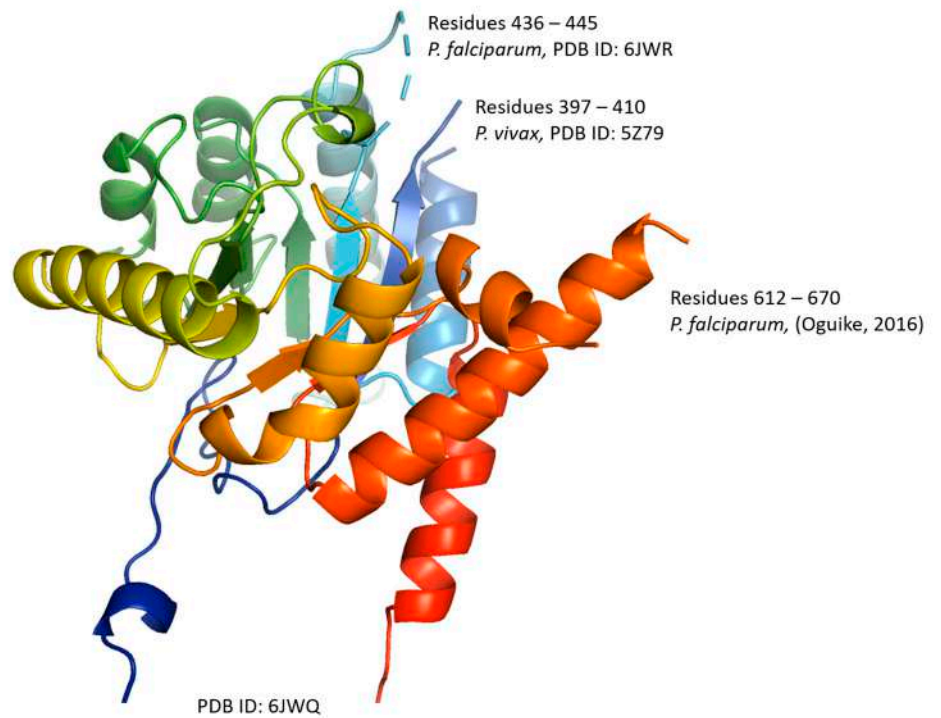


Figure S9. RMSD profiles of all *PfDHPS* residues across the eight systems in the presence of sulfadoxine over 200 ns of molecular dynamics simulations.



**Figure S10. Residues involved in the interaction with sulfadoxine for *PfDHPS* variants:** (A) WT, (B) ISgKAA, (C) IagKAA, (D) vagKAA, and (E) vagKgs. Sulfadoxine is shown in blue. The three key residues conserved across systems are Phe580 (D6), Lys609 and Arg610 (D7).



**Figure S11. Description of *Pf*DHPS structure building.** The initial structure of the WT *Pf*DHPS protein (residues from Ile 366 to Asp 708) was extracted from the Protein Data Bank (PDB) entry 6JWQ. To complete the missing parts, the positions of residues 397 – 410, 436 – 445 and 612 – 670 were extracted from the PDB entries 5Z79 (*Plasmodium vivax*), 6JWR (*Plasmodium falciparum*) and from a homology model, respectively.

**Table S1.** List of the studied systems with the corresponding mutations of interest.

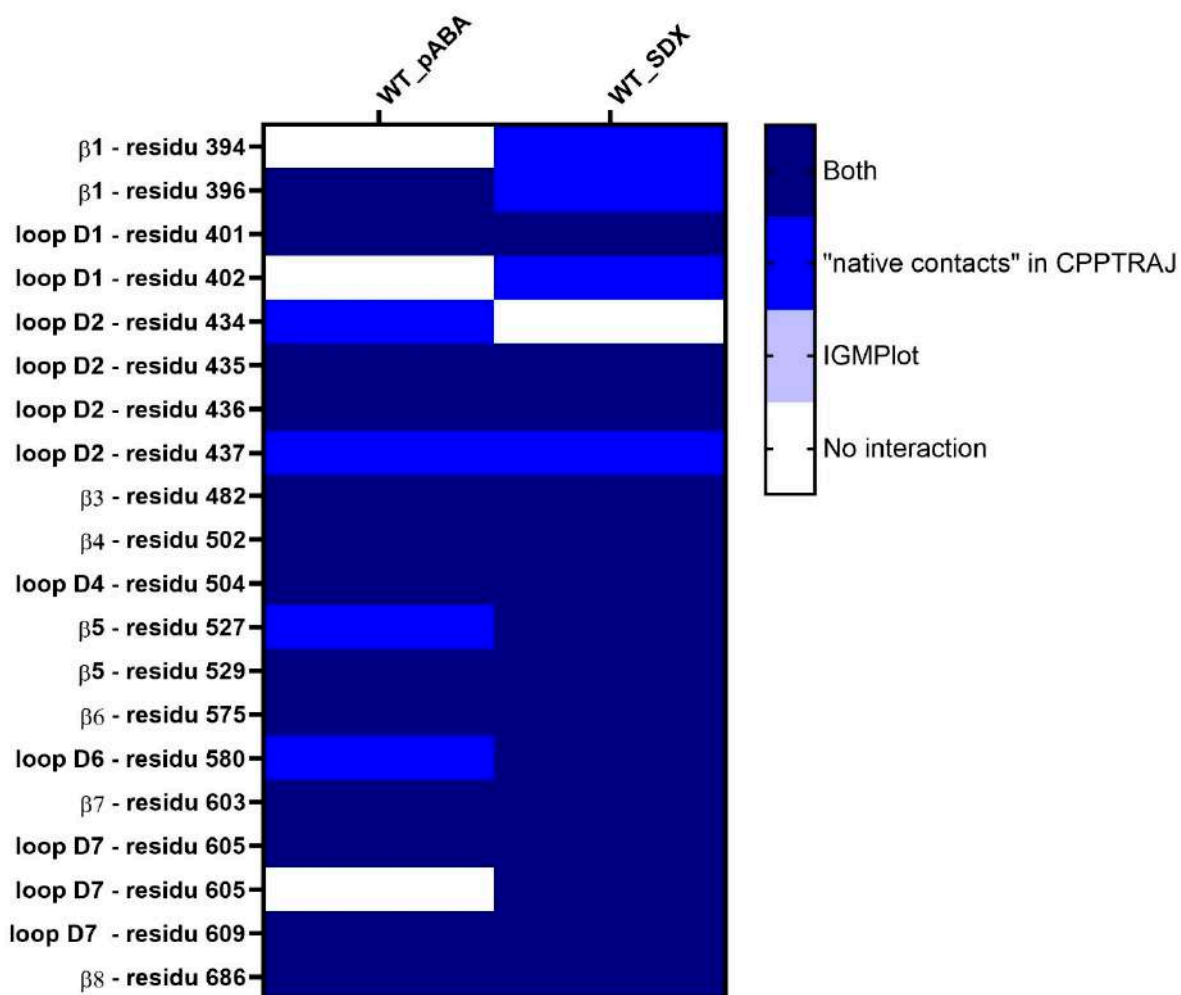
Codon	I431	S436	A437	K540	A581	A613
<b>WT (ISAKAA)</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT
<b>ISgKAA</b>	WT	WT	<b>M</b>	WT	WT	WT
<b>IagKAA</b>	WT	<b>M</b>	<b>M</b>	WT	WT	WT
<b>vSAKAA</b>	<b>M</b>	WT	WT	WT	WT	WT
<b>vagKAA</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	WT	WT	WT
<b>vagKgs</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	WT	<b>M</b>	<b>M</b>
<b>ISgegA</b>	WT	WT	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	WT
<b>vagegs</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>

WT: Wild-type; M: mutated; mutations are: isoleucine 431 with valine (I431V), serine 436 with alanine (S436A), alanine 437 with glycine (A437G), Lysine 540 with glutamine (K540E), alanine 581 with glycine (A581G), and alanine 613 with serine (A613S).

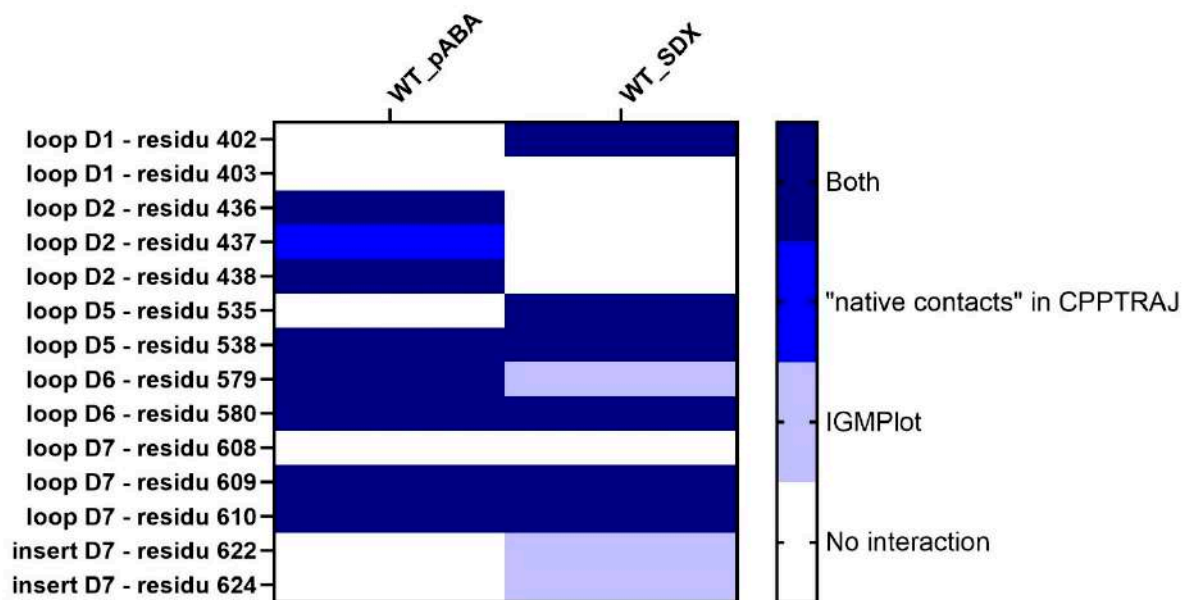




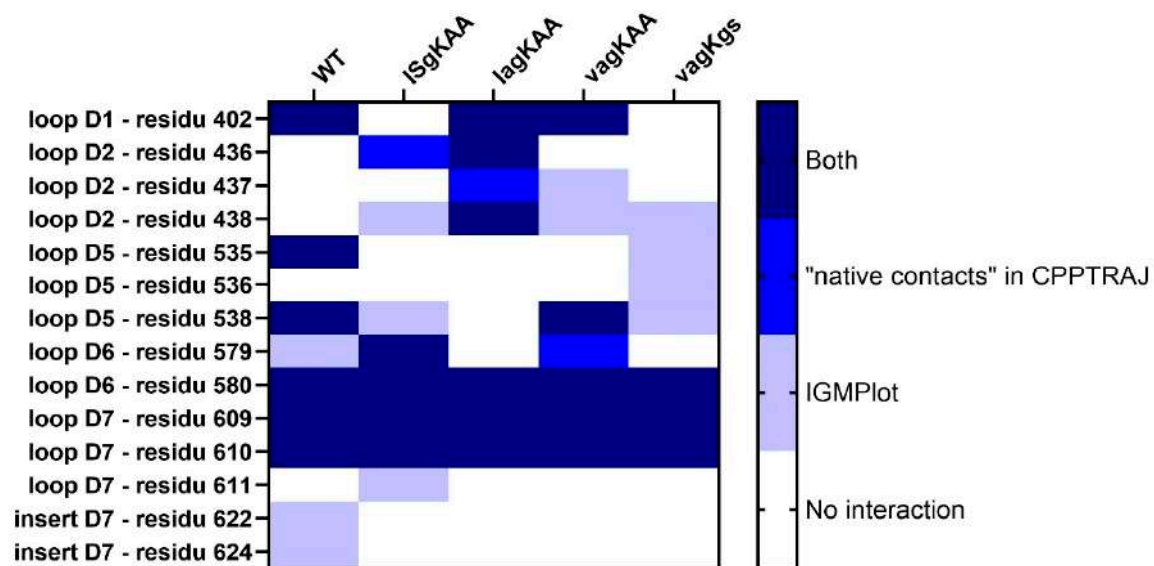
**Table S4. Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with DHPPP in the WT systems.**  
 Analysis was performed on the cluster representative frame using IGMPlot and confirmed by using the *native contacts* command in CPPTRAJ (meaning that interactions are present for at least 50% of the simulation time).



**Table S5. Residues involved in the interaction of *PfDHPS* with *p*ABA or sulfadoxine in the WT systems.** Analysis was performed on the cluster representative frame using IGMPlot and confirmed by using the *native contacts* command in CPPTRAJ (meaning that interactions are present for at least 50% of the simulation time).



**Table S6. Residues involved in the interaction of *Pf*DHPS with sulfadoxine.** Analysis was performed on the cluster representative frame using IGMPlot and confirmed by using the *native contacts* command in CPPTRAJ (meaning that interactions are present for at least 50% of the simulation time).



### 3. Discussion

Ce travail a permis l'obtention d'un système complet, équilibré et stable de la *PfDHPS*, à partir d'une structure cristalline (PDB ID : 6JWQ), en comblant les parties manquantes avec des structures DHPS de *P. falciparum* (194) et *P. vivax* (277). Des différences dans les interactions de l'enzyme avec les ligands naturels ou la sulfadoxine ont été relevées.

Tout d'abord, un des inserts spécifiques de la *PfDHPS*, l'insert D7, présente une flexibilité différente selon la présence ou l'absence de *pABA*. Dans nos simulations, cet insert est significativement plus flexible en présence du ligand naturel que de l'inhibiteur, la sulfadoxine. Ces inserts spécifiques aux parasites étant, d'après plusieurs études, impliqués dans la stabilisation de la structure des enzymes bifonctionnelles (279), de prochains travaux avec l'enzyme bifonctionnelle HPPK-DHPS de *P. falciparum* sont nécessaires.

Puis, la boucle D2 adopte une conformation fermée en présence des substrats naturels, alors qu'elle présente une conformation ouverte en présence de l'inhibiteur, la sulfadoxine. Elle affecte ainsi de manière significative la liaison aux ligands et apparaît comme un élément déterminant. Le *pABA*, ligand naturel, établit de nombreuses interactions avec cette boucle D2 dans la conformation fermée. A l'inverse, dans les systèmes avec l'inhibiteur, une diminution des interactions entre cette boucle D2 et la sulfadoxine est observée. L'ouverture de cette boucle D2 entraîne une libération de la sulfadoxine du site actif. Ce phénomène avait déjà été observé, pour quelques mutants de la *PfDHPS*, dans les travaux de Boateng *et al.* (283).

En présence du ligand naturel, les différents systèmes étudiés présentent également des divergences.

Alors que les interactions avec le *pABA* sont similaires dans les systèmes WT, ISgKAA, IagKAA, vagKAA et vagegs, les systèmes ISgegA, vSAKAA et vagKgs se démarquent. La boucle D2 ne participe pas à la stabilisation du *pABA* dans le système ISgegA. Il en résulte une plus faible affinité de liaison. A l'inverse, une boucle supplémentaire, la boucle D1, intervient dans la liaison du *pABA* pour les formes mutantes vSAKAA et vagKgs de *PfDHPS*.

Le mutant vagKgs se démarque également des autres systèmes par la réorganisation substantielle du site actif, qui pourrait avoir des implications sur son efficacité catalytique.

Enfin, une réduction de la distance entre les atomes réactifs du *pABA* et de DHPPP est observée en présence de la combinaison des mutations Ile431Val, Ser436Ala et Ala437Gly. Ce

positionnement plus favorable du *pABA* par rapport DHPPP pourrait améliorer l'efficacité catalytique de la *PfDHPS* en facilitant la formation de liaisons covalentes, étape critique du mécanisme catalytique. L'évaluation de l'activité catalytique de l'enzyme par des calculs hybrides QMMM permettront de confirmer, ou non, cette hypothèse.

## 4. Perspectives

### 4.1. Evaluation de nouveaux inhibiteurs de la *PfDHPS*

Les outils *in silico* apparaissent ainsi comme indispensables pour d'une part, caractériser les changements structuraux et dynamiques des enzymes mutées et d'autres part, comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs. Les structures de la *PfDHPS*, sous sa forme sauvage et sous différentes formes mutées, obtenues au cours de ce travail sont des prérequis indispensables pour l'évaluations de nouveaux inhibiteurs.

Tout d'abord, les sulfamides, qui regroupent de très nombreuses molécules, sont tous des analogues structuraux du *pABA*, entrant en compétition avec ce dernier. Des milliers de dérivés des sulfamides ont été rapportés pour diverses activités biologiques (304). Certaines d'entre eux présentent une activité anti-plasmodiale, mais aucune de ces molécules n'a été évaluée en présence des nouveaux mutants de la *PfDHPS*. Le repositionnement thérapeutique présente l'avantage de diminuer de manière substantielle le processus de découverte de médicaments (305). L'évaluation de ces sulfamides, par différents outils de docking, permettra d'étudier ces potentielles alternatives thérapeutiques. En cas de succès, ces médicaments préexistants pourront, par la suite, être optimisés. Trejo *et al.* ont proposé une modification structurelle de la sulfadoxine. Certains des dérivés obtenus présentaient une meilleure activité anti-plasmodiale *in vitro* (306).

Ces structures de la *PfDHPS* permettront également le screening de larges bases de composés chimiques (307) avec pour objectif d'identifier de nouvelles structures inhibitrices de la *PfDHPS*.

### 4.2. Prédiction du risque d'émergence de nouveaux génotypes de résistance

L'émergence de nouvelles mutations sur le gène *pf dhps* pourraient augmenter le niveau de résistance à la sulfadoxine, et compromettre un peu plus son utilisation. A partir de la structure de la *PfDHPS* obtenue au cours de ce travail, l'identification des « hot spots » pourra être

réalisée, par une approche innovante développée par l'équipe de Brut *et al.* (308, 309). Ces « hot spots » sont des résidus qui contribuent de manière significative à des caractéristiques structurelles et fonctionnelles de l'enzyme. Cela permettra ainsi d'anticiper cette émergence, et d'être particulièrement vigilants à ces potentielles nouvelles mutations lors des prochaines études de terrain.

Enfin, la compréhension des effets des mutations sur le site actif sera affinée par des calculs hybrides QMMM. Cette méthode hybride permettra également d'évaluer les effets des mutations sur l'activité catalytique de l'enzyme.

## V. Décryptage du mécanisme réactionnel de la PfDHPS

### 1. Introduction

La méthodologie hybride QM/MM est un outil précieux pour la modélisation des biomolécules et présente l'avantage de pouvoir affiner la compréhension des effets des mutations sur le site actif. De plus, il s'agit de la méthode de choix pour la modélisation des réactions chimiques dans les systèmes macromoléculaires complexes (266). La description quantique, appliquée à une région restreinte du système, est essentielle pour décrire les réactions chimiques. Le reste du système est représenté à un niveau plus simple par des champs de force empiriques.

Des études détaillées du mécanisme réactionnel de la DHPS ont été réalisées (281, 288) à partir des structures des DHPS de *B. anthracis* et *Y. pestis*, partageant 22% et 24% d'identité de séquence avec la DHPS de *P. falciparum*, respectivement (254). Un mécanisme réactionnel de type  $S_N2$  pour la DHPS a tout d'abord été proposé par Baca *et al.* (286), corroboré par les observations de Babaoglu *et al.* (287). A l'inverse, un mécanisme réactionnel de type  $S_N1$  a été proposé par Yun *et al.* à partir de données de cristallographie, où un intermédiaire réactionnel cationique de type ptérine était observé (281). Ce mécanisme réactionnel de type  $S_N1$  a également été privilégié par Chotpatiwetchkul *et al.* en raison de l'échec des tentatives pour un mécanisme réactionnel  $S_N2$  dans ces travaux, dû au pKa élevé de la fonction amine du pABA et de sa distance trop importante au groupement pyrophosphate (288).

En raison du manque de structure cristalline de la PfDHPS jusqu'en 2020, l'exploration du mécanisme réactionnel à partir de la DHPS de *P. falciparum*, n'a quant à elle, jamais été réalisée. Il est crucial d'élucider, d'une part le mécanisme catalytique mis en jeu par la PfDHPS et, d'autre part, la base mécanistique de la résistance aux sulfamides par l'évaluation de l'effet des mutations sur l'activité catalytique.

Ce travail, présenté ici, a été rendu possible par l'obtention préalable, par dynamique moléculaire, d'un système complet, équilibré et stable de la PfDHPS. Cette étude, réalisée par simulation hybride QM/MM à l'aide d'une méthode semi-empirique, est un travail exploratoire préliminaire.

### 2. Unravelling the PfDHPS catalytic mechanism through molecular dynamics simulations

*Emilie Guémas, Sandie Ménard, Antoine Berry et Marie Brut*

1 **Unravelling the *Plasmodium falciparum* DHPS catalytic mechanism through**  
2 **QM/MM dynamics**

3 Emilie GUEMAS<sup>1,2,3,\*</sup>, Sandie MENARD<sup>2</sup>, Antoine BERRY<sup>2,3</sup>, Marie BRUT<sup>1</sup>

4

5 1. LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

6 2. Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse,  
7 CNRS UMR5051, INSERM UMR 1291, Toulouse, France

8 3. Service de Parasitologie et Mycologie, CHU Toulouse, Toulouse, France

9 \* corresponding author: [guemas.e@chu-toulouse.fr](mailto:guemas.e@chu-toulouse.fr)

10

11 Keywords: *Plasmodium falciparum*, DHPS, catalytic mechanism, QM/MM

12

13 **Abstract**

14 Sulfadoxine inhibits the *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (*Pf*DHPS) and is used as a  
15 preventive treatment in pregnant women and children in Africa, in combination with pyrimethamine.  
16 *Pf*DHPS catalyses the condensation of p-aminobenzoic acid with 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin  
17 pyrophosphate to form 7,8-dihydropteroate, an essential intermediate in the folate pathway.  
18 However, resistance has emerged and its efficacy is threatened.

19 To date, the reaction mechanism of DHPS is poorly understood and that of *Pf*DHPS has not been  
20 studied. In this study we presented a preliminary exploratory work, using a hybrid QMMM method, to  
21 explore SN1 and SN2 mechanisms. We aimed to compare energy level trends between different  
22 systems. The SN2 mechanism was favored in this work. Extensive work is now being carried out.

## 23 Introduction

24 Malaria remains a major public health problem, causing 600,000 deaths in 2023, the majority of which  
25 being children under 5 years of age in Africa. *Plasmodium falciparum* is the main species responsible  
26 for these deaths (1). Pregnancy is also a period of vulnerability to malaria, and pregnant women  
27 represent the second most at-risk population. Pregnancy-associated malaria can lead to maternal or  
28 neonatal death (2). The sulfadoxine–pyrimethamine combination is used in Africa as a preventive  
29 treatment for children and pregnant women as part of seasonal malaria chemoprevention and  
30 intermittent preventive treatment, respectively (1). Sulfadoxine and pyrimethamine target enzymes  
31 involved in the obligate folate biosynthesis pathway, dihydropteroate synthase (DHPS) and  
32 dihydrofolate reductase (DHFR), respectively. However, *P. falciparum* has developed resistance to  
33 sulfadoxine–pyrimethamine due to point mutations. So far, six main point mutations of *PfDHPS* have  
34 been reported: Ile431Val, Ser436Ala, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly, Ala613Ser. The impact of these  
35 mutations in *PfDHPS* on the catalytic mechanism is not known.

36 DHPS is an enzyme found in prokaryotes and lower eukaryotes, it is absent in humans. It catalyses the  
37 nucleophilic substitution of p-aminobenzoic acid (*pABA*) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin  
38 pyrophosphate (DHPPP) to form 7,8-dihydropteroate, an essential intermediate in the folate pathway.  
39 The first crystal structure of the *P. falciparum* DHPS was recently released, in 2020 by Chitnumsub *et*  
40 *al.* (3).

41 The reaction mechanism of DHPS remains poorly studied to date, and the order of nucleophilic  
42 substitution is not yet clearly defined. Baca *et al.* suggested a SN2 mechanism (4). Nucleophilic attack  
43 of the amine group of *pABA* and the release of pyrophosphate would occur together, although the  
44 amine group of *pABA* is weakly nucleophilic. This hypothesis was corroborated by the observations of  
45 Babaoglu *et al.* (5). Crystallographic data using DHPS enzymes from *Bacillus anthracis* and *Yersina pestis*  
46 then revealed intermediate structures where the pterin-pyrophosphate bond of DHPPP was broken,  
47 while the pterin-*pABA* bond had not yet formed. Moreover, in the absence of *pABA* or when it was  
48 replaced by its analogue, p-hydroxybenzoic acid, pyrophosphate was still released. Thus, a SN1  
49 mechanism, with the formation of a cationic pterin intermediate, was proposed. QM calculations using  
50 the density functional theory (DFT) method complemented these observations and demonstrated that  
51 the intermediate was stable (6). Chotpatiwetchkul *et al.* then studied the reaction mechanism using  
52 the hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) method, using DHPS from *Y. pestis*. In  
53 this work, attempts to simulate SN2 reaction mechanism failed. A SN1 mechanism, with the presence  
54 of a reaction intermediate, was then favored (7).

55 Due to the lack of availability of the *Pf*DHPS crystal structure, no study using the *P. falciparum* structure  
56 to elucidate the DHPS reaction mechanism has been carried out to date. In this study, we investigate  
57 the reaction mechanism of the *Pf*DHPS. To this end, we worked on an equilibrated structure resulting  
58 from molecular dynamics (MD) simulations of the *Pf*DHPS crystal structure. In order to elucidate the  
59 reaction, we performed QM/MM simulations using a semi-empirical method.

## 60 **Methods**

### 61 **Systems studied**

62 Eight *Pf*DHPS systems were studied and named according to the amino acids present at positions 431,  
63 436, 437, 540, 581 and 613; the wild-type amino acid is stated in uppercase, and the mutated amino  
64 acid in lowercase. The wild-type enzyme (ISAKAA) and vSAKAA, ISgKAA, lagKAA, vagKAA, vagKgs,  
65 ISgegA and vagegs mutants were selected.

### 66 **Molecular structures**

67 The *Pf*DHPS previously obtained from classical MD was used for QM/MM calculations (8). Briefly, the  
68 initial structure of WT *Pf*DHPS protein (residues from Ile366 to Asp708) was extracted from the Protein  
69 Data Bank (PDB) entry 6JWQ (3). The missing parts in 6JWQ, corresponding to residues 397 – 410, 436  
70 – 445 and 612 – 670, were extracted from the PDB entry 5Z79 (9) and 6JWR, and from an homology  
71 model of *Pf*DHPS (10), respectively. Residues 407 (leucine 407 with isoleucine) and 410 (aspartic acid  
72 410 with glutamine) were modified in accordance with the *Pf*DHPS WT sequence. The structures of the  
73 ligands, DHPPP and *p*ABA, were retrieved from the PDB entry 6JWR (3). A Mg<sup>2+</sup> cofactor coordinates  
74 the diphosphate group within DHPPP.

75 All MD simulations were performed with the AMBER package, using the ff14SB force-field (11). Ligand  
76 parameters were generated using the General Amber Force Field (GAFF) (12) and prepared with the  
77 Antechamber programs (13). The Leap module was used to prepare the *Pf*DHPS/ligand complexes. All  
78 the systems were solvated in a cubic box with a minimal distance of 8.0 Å between the protein and the  
79 box edge, using the TIP3P water model (14). The total charge of the system was neutralized with Cl<sup>-</sup>  
80 ions.

81 The crystallographic structures were equilibrated using classical MD, and MD simulations were  
82 performed for a total of 200 ns.

83 The clustering was performed using the density-based spatial clustering of applications with noise  
84 method (DBSCAN), with 25 as the minimum number of points required to form a cluster and a distance  
85 threshold of 0.9 Å between points to form a cluster (15).

## 86 QM/MM molecular dynamics simulations

87 All QM/MM molecular dynamics simulations were carried out using the AMBER package (16). Each  
88 molecular system was partitioned into a QM and a MM region. All cuts in covalent bonds between the  
89 QM and MM regions were applied in C-C bonds and the QM region was capped with hydrogen atoms.

90 In all QM/MM simulations, the quantum part was treated at semi-empirical parameterized model  
91 number 3 (PM3) level of theory, and MM region was evaluated with the classical ff14SB force field  
92 (11). The nonbonded cutoff for the long-range electrostatic interactions was set at 12 Å and 8 Å for the  
93 MM and QM region, respectively. The QM region of the QM/MM model contained the key active site  
94 residues.

95 Two QM regions have been studied for the WT structure. The first QM region included Asn396, Ser401,  
96 Ser435, Ser436, Asp482, Lys609, Arg686, His688, the substrate (*p*ABA and DHPPP), metal cofactor  
97 ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules, and six other water molecules. Because of diffusion,  
98 their MM and QM identity was updated when the water molecules exited the active site and when  
99 new water molecules reached the QM region. The second one was smaller and included Ser435,  
100 Ser/Ala436, Ala/Gly437, Asp482 Lys609, Arg686, the substrate (*p*ABA and DHPPP), metal cofactor  
101 ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules. This region was used for the others systems. All other  
102 atoms were described at the MM level.

103 First, the system was energy minimized without constraint employing the steepest-conjugate gradient  
104 scheme. Then it was heated at 300 K in the NVT ensemble (i.e., the number of particles  $N$ , the volume  
105  $V$ , and the temperature  $T$  of the system are kept constant) for 50 ps with a 1fs time step. The density  
106 was equilibrated in the same ensemble for 25 ps. The stochastic Langevin thermostat was used to keep  
107 the temperature at 300 K with a collision frequency of 2 ps<sup>-1</sup>. To prevent excessive movement of the  
108 protein backbone during initial equilibration, a harmonic restraint was applied to the alpha carbon  
109 atoms and backbone nitrogen atoms, carbon and oxygen atoms of residues Ile366 to Asp708. This  
110 restraint was progressively reduced from 10.0 kcal mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> in the heating phase, to 5.0 kcal mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup>  
111 during density equilibration, then to 2.0 kcal mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-2</sup> during equilibration and production. QM/MM  
112 simulations were performed for a total of 1 ns by portions of 100 ps. A snapshot corresponding to the  
113 shortest interatomic distance found between C9 of DHPPP and N of *p*ABA was extracted for each  
114 system.

115 In addition, another protonation state of *p*ABA and DHPPP was studied, by removing a hydrogen atom  
116 from nitrogen and C9 atoms, respectively.

117 The root mean square deviation (RMSD) was computed along the simulations using the *cpptraj* utility  
118 of AMBER (17).

119 The PYMOL software (18) and the Visual Molecular Dynamics (VMD) (19) software were used to  
120 visualize the structures and trajectories.

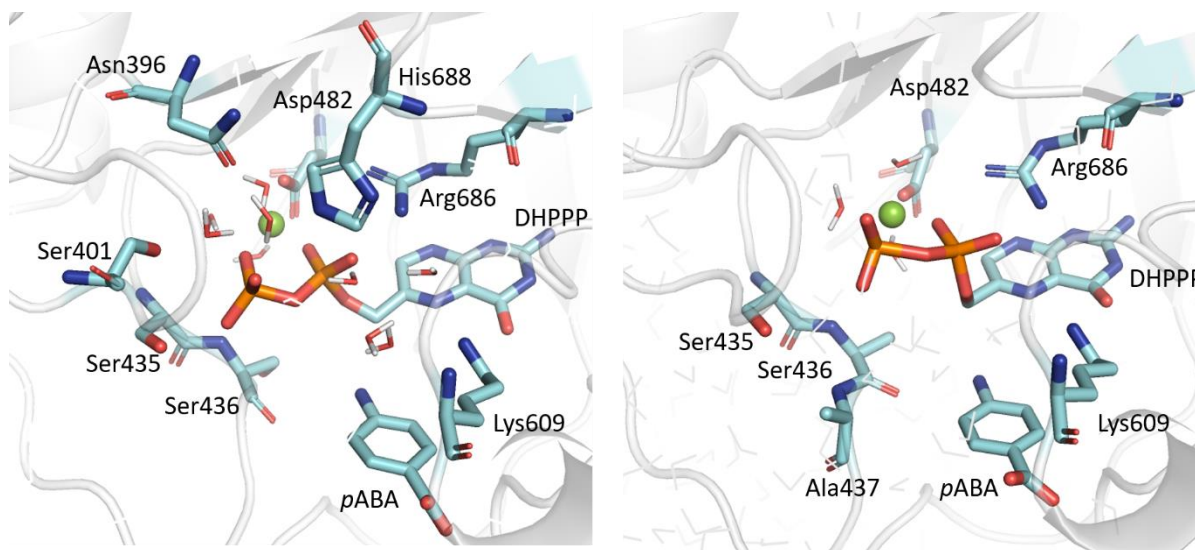
## 121 Reaction

122 The linear combination of distances (LCOD) method, in which the reaction coordinate is defined by  
123 changing two distances simultaneously was used. The two atomic distances concerning the reaction  
124 were linearly combined as a collective variable (CV).

## 125 Results

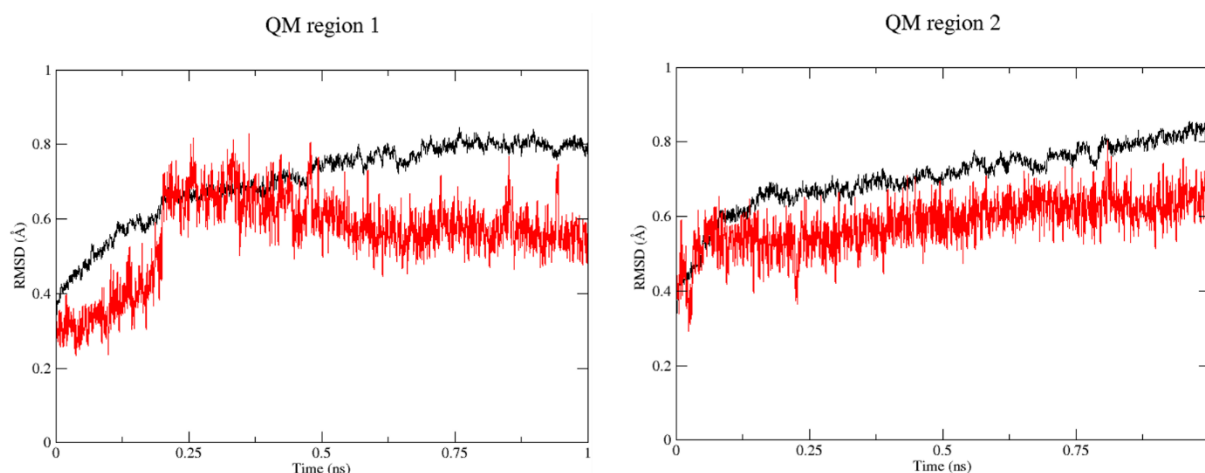
### 126 WT system

127 The final frame of the 200 ns MD simulations was used to perform first QM/MM molecular dynamics  
128 simulations and to compare two QM regions for WT *PfDHPS*. The first one consisted of 196 atoms, the  
129 second one was smaller, with 146 atoms (figure 1). The net charge of both QM regions was -1.



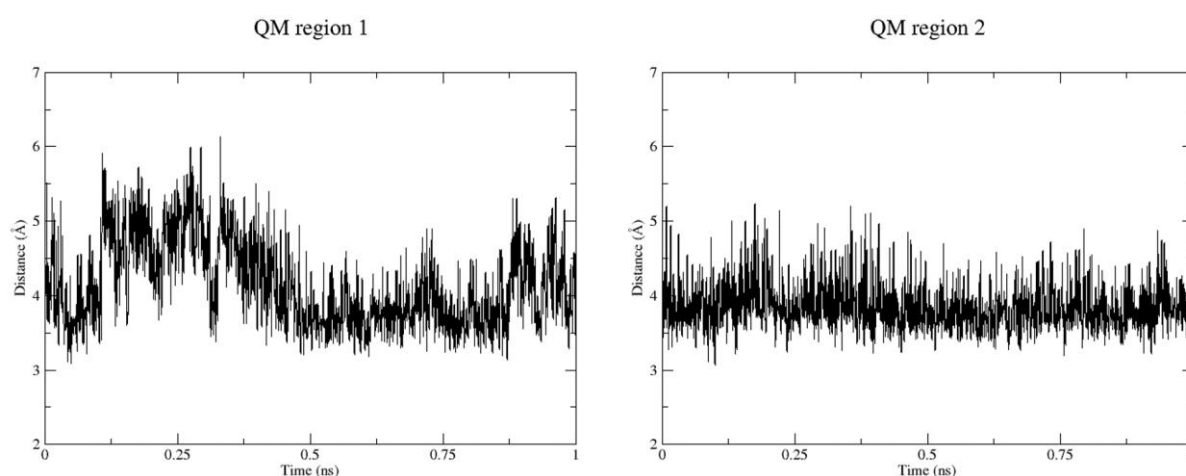
**Figure 1. The two QM regions studied for the WT structure.** The first QM region included Asn396, Ser401, Ser435, Ser436, Asp482, Lys609, Arg686, His688, *p*ABA, DHPPP, metal cofactor ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules, and six other water molecules. The second one was smaller and included Ser435, Ser436, Ala437, Asp482 Lys609, Arg686, *p*ABA, DHPPP, metal cofactor ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules.

130 RMSD values were computed along the trajectories and showed no significant difference between  
131 both QM regions (figure 2). The total energy of both systems is constant during the production runs,  
132 ensuring the simulations are stable (figure S1).



**Figure 2. RMSD profiles of the two *PfDHPS* WT systems with different QM regions over 1 ns of molecular dynamics simulations.** RMSD profiles of all *PfDHPS* residues is represented in black and of residues including in the QM region in red. The first QM region included Asn396, Ser401, Ser435, Ser436, Asp482, Lys609, Arg686, His688, *pABA*, DHPPP, metal cofactor ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules, and six other water molecules. The second one was smaller and included Ser435, Ser436, Ala437, Asp482 Lys609, Arg686, *pABA*, DHPPP, metal cofactor ( $Mg^{2+}$ ) with three coordinated water molecules.

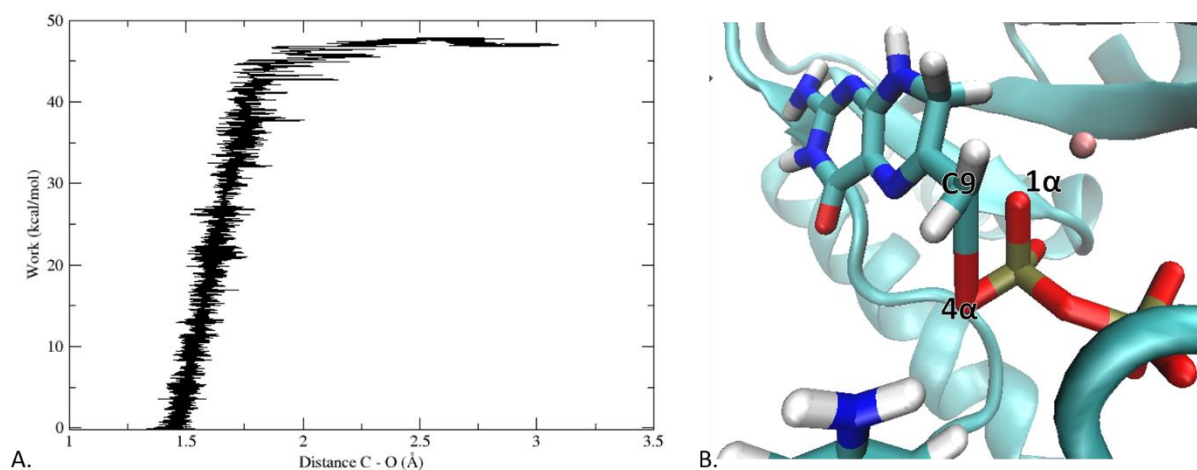
133 As *PfDHPS* catalyzes the formation of a covalent bond between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen  
 134 atom of *pABA* (figure S2), this interatomic distance was measured in each system during the  
 135 simulations and is presented in figure 3. The minimum distances do not differ between the 2 systems  
 136 (3.09 Å versus 3.08 Å), but the average distance for the QM region 2 (3.85 +/- 0.31 Å) is smaller than  
 137 for the QM region 1 (4.15 +/- 0.57 Å). This result is corroborated by greater system stability with the  
 138 QM region 2, as shown by RMSD profiles (figure 2).



**Figure 3. Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and the nitrogen atom of *p*-aminobenzoic acid.**

139 **Catalytic mechanism.** Due to the identical minimum distance and lower average value, further  
140 investigations were carried out with QM region 2. A snapshot corresponding to the shortest  
141 interatomic distance found between C9 of DHPPP and N of *p*ABA was extracted.

142 First, we studied the cleavage of the C9-O bond of DHPPP, initial step of a SN1 mechanism. Breaking  
143 the C9 – O4 $\alpha$  bond led to the formation of the C9 – O1 $\alpha$  bond as shown in figure 4. This observation  
144 for this first trial is unfavorable and no further investigation was carried out.

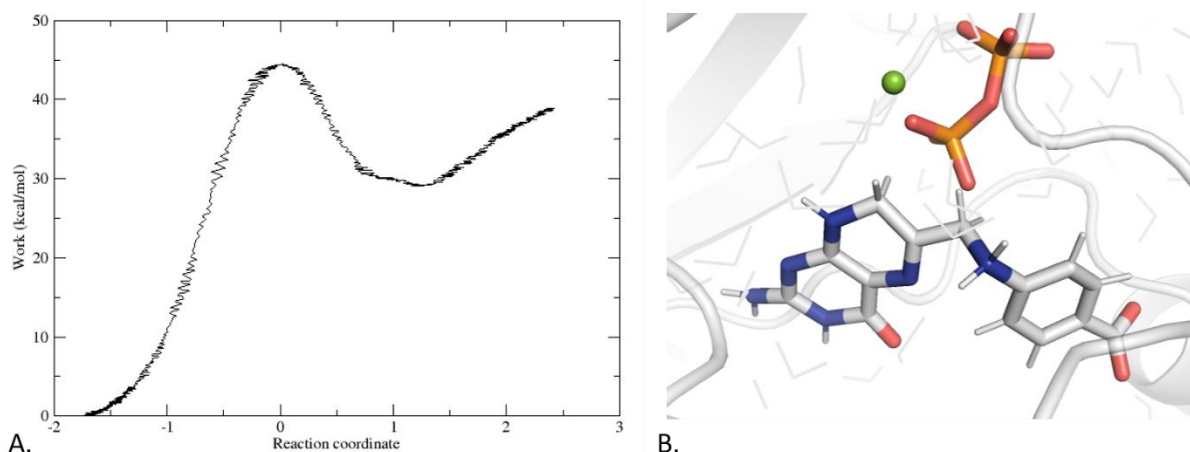


**Figure 4. (A) Evolution of the energy during the cleavage of the C9-O bond of DHPPP (B) Breaking the C9 – O4 $\alpha$  bond of DHPPP led to the formation of the C9 – O1 $\alpha$  bond.**

145 Then, we studied a SN2 mechanism, in which the nucleophilic attack can occur in concert with the  
146 breaking of the C-O bond and the departure of the PPi group. Linear combination of distances (LCOD)  
147 method was used. The collective variable (CV) consisted of the distance between the two atoms in the  
148 breaking bond (C9-O of DHPPP), and the distance between the two atoms in the forming bond  
149 (nitrogen of *p*ABA and the C9 of DHPP).

$$150 \text{ CV} = d(\text{C9}_{\text{DHPPP}} \leftrightarrow \text{O4}\alpha_{\text{DHPPP}}) - (\text{C9}_{\text{DHPPP}} \leftrightarrow \text{N}_{\text{pABA}})$$

151 The reaction occurred, with a barrier of 44.4 kcal/mol (figure 5A), which is acceptable. The product  
152 obtained corresponds to DHP with an additional hydrogen atom located on the nitrogen supplied by  
153 *p*ABA (figure 5B). We admit here that we found a product that is not the final one, and that a last  
154 deprotonation step should lead to a more stable product. However, in this configuration, the distance  
155 of 4.5 Å between the excess hydrogen atom in the product and the PPi did not allow a proton transfer.  
156 Furthermore, no acceptor in a close environment was found to be possibly involved.

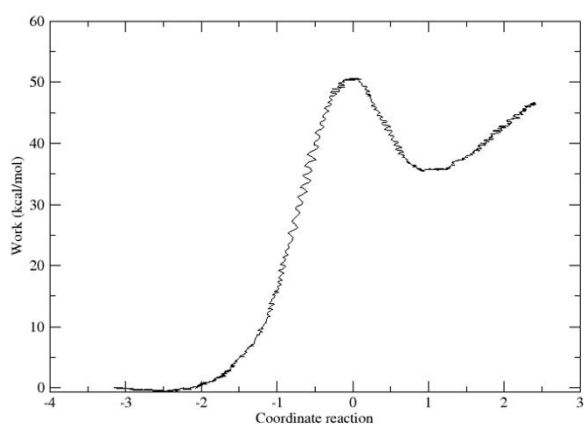


157 **Figure 5. Reaction according to a SN2 mechanism. (A) Evolution of the energy during the reaction. (B) The**  
 158 **resulting product has an additional hydrogen atom located on the nitrogen supplied by *pABA*.**

159

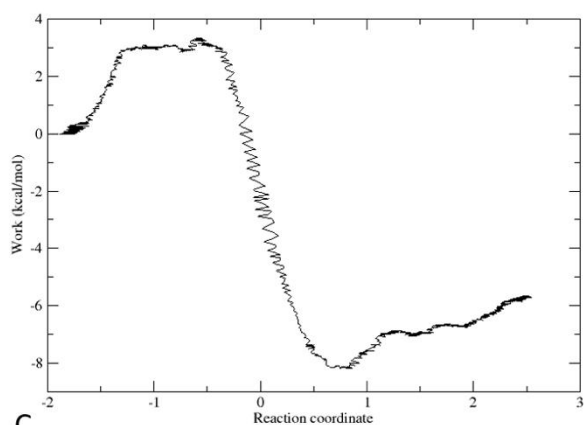
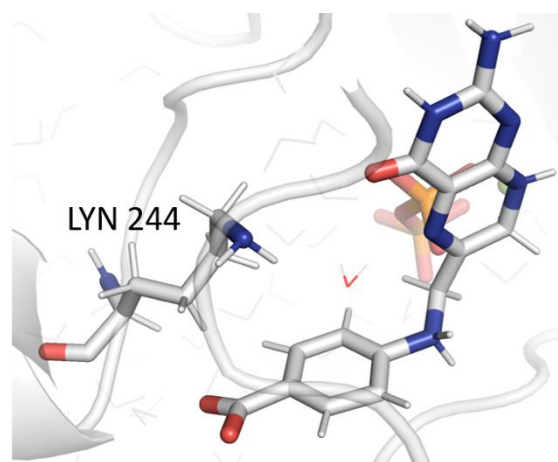
160 Based on the work of Chotpatiwetchkul *et al.*, who studied the reaction mechanism of DHPS in *Yersina*  
 161 *pestis*, in which a lysine residue participated in hydrogen transfer (7), the involvement of a lysine  
 162 residue in hydrogen transfer was tested in our system. In their model, the lysine residue was located  
 163 near the nitrogen of *pABA* whereas in our model, a water molecule forms a bridge between the lysine  
 164 and *pABA*. Lysine 609 was modified and replaced by a deprotonated lysine (LYS replaced by LYN in the  
 165 PDB file).

166 The first reaction occurred, with a barrier of 50.7 kcal/mol (figure 6A). The product obtained is the  
 167 same that previously observed (figure 6B), i.e. DHP with an additional hydrogen atom located on the  
 168 nitrogen supplied by *pABA*. Then, a second reaction, with a very low energy barrier (3.0 kcal/mol, figure  
 169 6C) allows the hydrogen to be transferred via a water molecule to the deprotonated lysine (figure 6D).  
 170 Unfortunately, this encouraging result could not be reproduced.



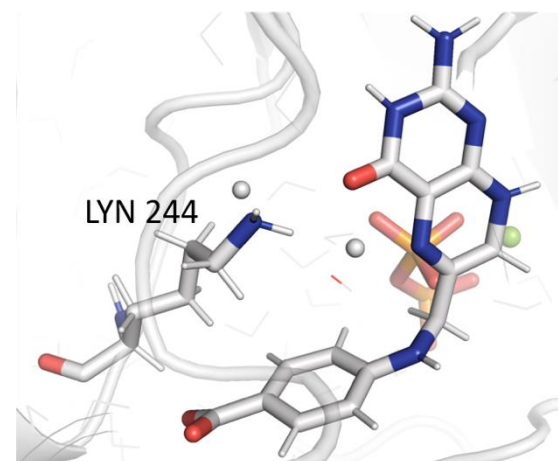
A.

B.



C.

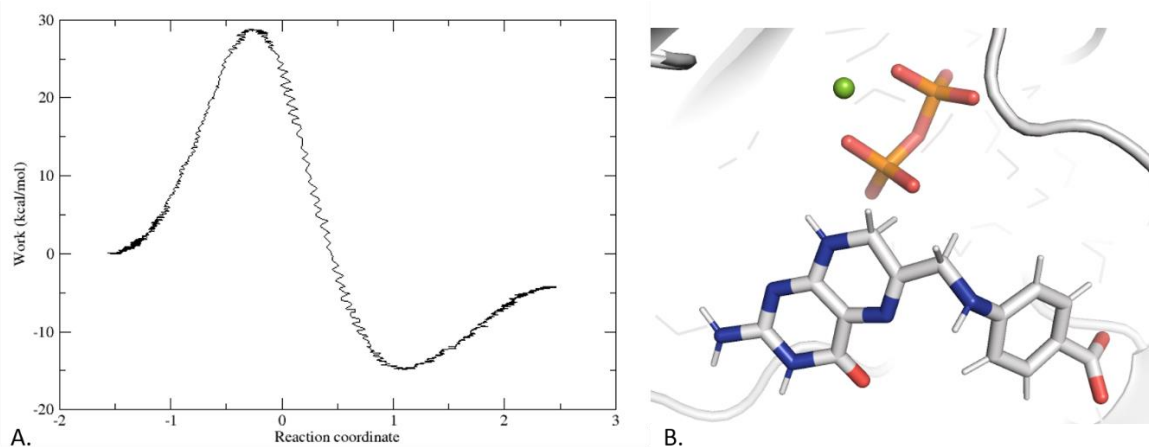
D.



171  
 172 **Figure 6. Reaction according to a SN2 mechanism with the involvement of a lysine residue in the hydrogen**  
 173 **transfer.** The resulting product of the first reaction, (A) with a barrier of 50.7 kcal/mol, (B) has an additional  
 174 hydrogen atom located on the nitrogen supplied by *p*ABA. Then, a second reaction, (C) with a barrier of 3.0  
 175 kcal/mol, (D) allows the hydrogen to be transferred via a water molecule to the deprotonated lysine.

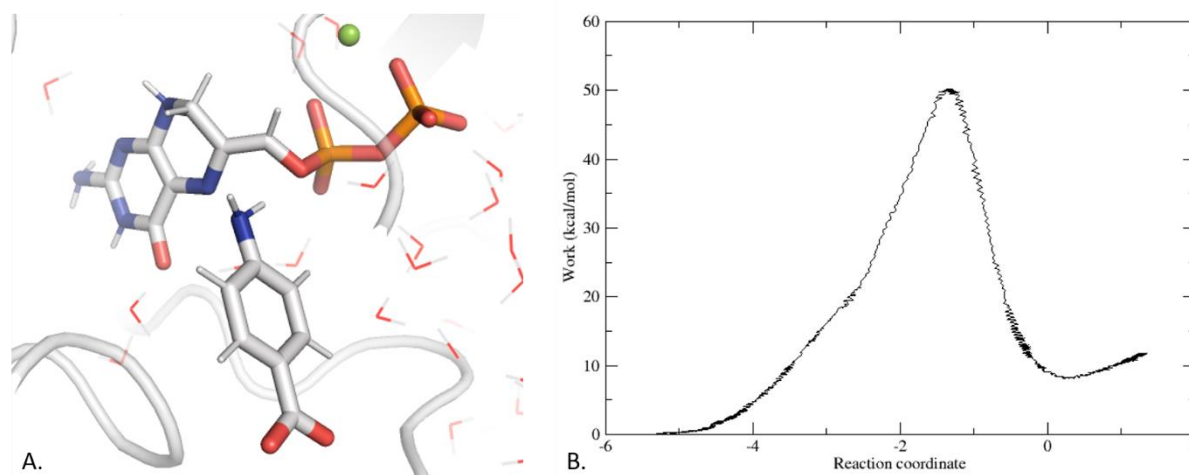
176

177 **Removal of a hydrogen atom.** To overcome the difficulty posed by this excess hydrogen atom, a  
 178 system with a different protonation state of *p*ABA, in which the hydrogen from nitrogen has been  
 179 removed, was investigated. The QM region 2 was used, with 145 atoms for this system and the net  
 180 charge of the QM region was -2. An exothermic reaction occurs, with a barrier of 29.7 kcal/mol (figure  
 181 7A). The product obtained corresponds to DHP (figure 7B).



**Figure 7. Reaction according to a SN2 mechanism. A hydrogen atom from *p*ABA was artificially removed. (A) Evolution of the energy during the reaction. (B) The resulting product is DHP.**

182 We also examined the case where the hydrogen at the C9 position of DHPPP was removed (figure 8A).  
 183 In this case, an endothermic reaction occurs, with a barrier of 50.1 kcal/mol (figure 8B). The abstraction  
 184 of hydrogen from *p*ABA is more favorable, as it involves a lower energy barrier.



**Figure 8. Reaction according to a SN2 mechanism. (A) A hydrogen atom from C9 of DHPPP was artificially removed. The resulting product is DHP. (B) Evolution of the energy during the reaction.**

### 185 Mutant systems

186 To compare the 8 different systems with each other, clustering of the 200 ns MD simulations was  
 187 performed to obtain the initial configuration of each system to perform QM/MM molecular dynamics  
 188 simulations. The total energy of all eight systems complexed remained stable throughout the 1 ns

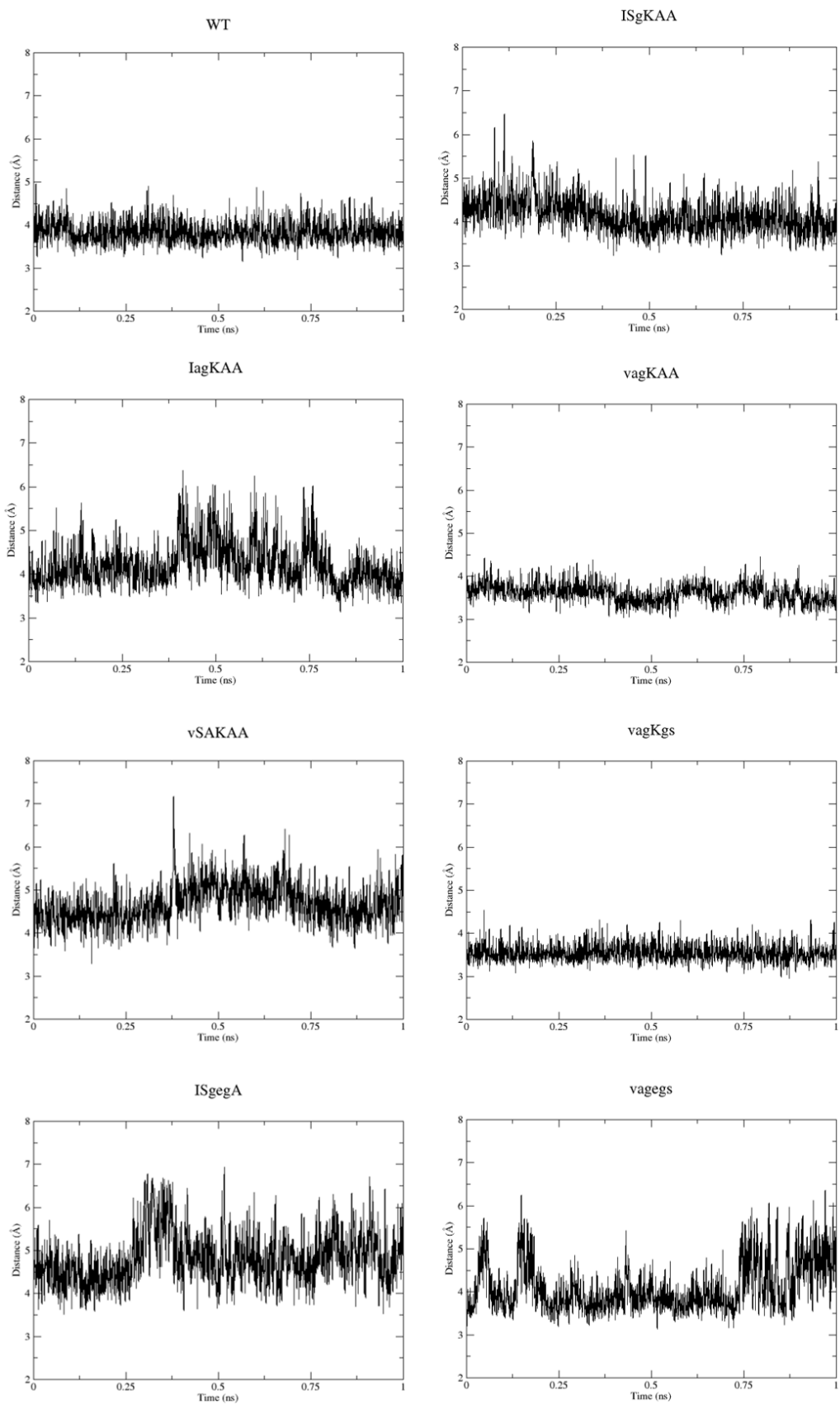
189 production, ensuring the overall stability of the simulations (figure S3). The RMSD values (figure S4)  
190 with mean values ranging from 0.62 +/- 0.08 Å for the vagKgs system to 0.67 +/- 0.10 Å for ISgKAA and  
191 ISgegA, indicate overall structural stability.

192 The interatomic distance between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen atom of *p*ABA was  
193 measured in each system during the simulations (table 1, figure 9). The minimum distance was  
194 observed for the vagKgs and vagKAA systems, for which the minimum distance is less than 3 (2.95 Å  
195 and 2.99 Å, respectively). The highest minimum distance is observed for the ISgegA system, with  
196 3.53 Å.

**Table 1. Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and the nitrogen atom of *p*-aminobenzoic acid, measured throughout the 1 ns QM/MM simulations for each system.**

	<b>Average +/- Std. Dev (Å)</b>	<b>Minimum (Å)</b>
<b>WT</b>	3.84 +/- 0.26	3.16
<b>ISgKAA</b>	4.16 +/- 0.40	3.23
<b>lagKAA</b>	4.23 +/- 0.50	3.16
<b>vSAKAA</b>	4.68 +/- 0.45	3.3
<b>vagKAA</b>	3.61 +/- 0.21	2.99
<b>vagKgs</b>	3.55 +/- 0.19	2.95
<b>ISgegA</b>	4.82 +/- 0.59	3.53
<b>vagegs</b>	4.11 +/- 0.56	3.15

197



**Figure 9.** Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and the nitrogen atom of *p*-aminobenzoic acid, measured throughout the 1 ns of QM/MM simulations.

198 A snapshot corresponding to the shortest interatomic distance found between C9 of DHPPP and N of  
199 *p*ABA was extracted for each system. A hydrogen atom from nitrogen of *p*ABA was removed, and  
200 minimization was performed.

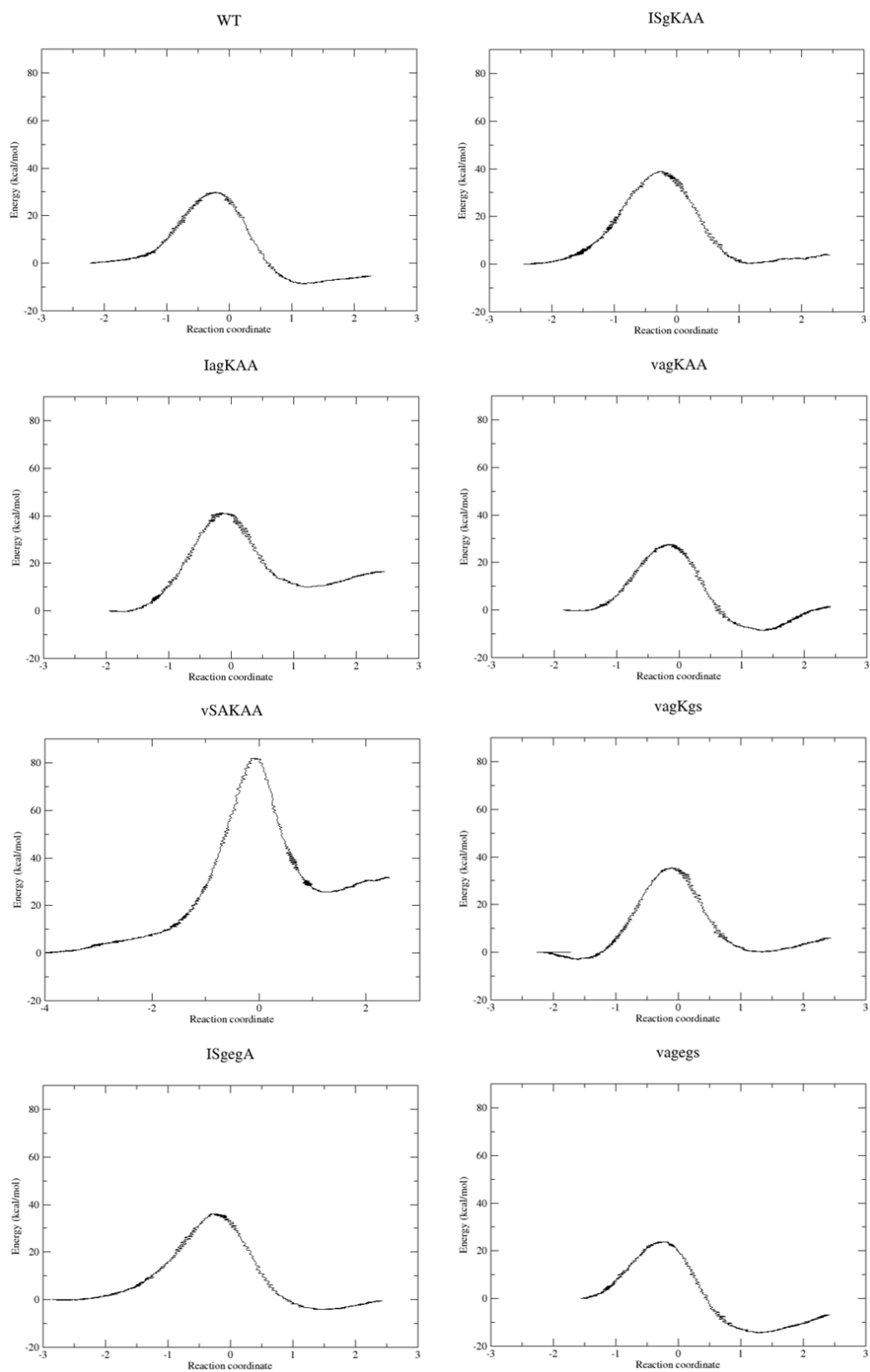
201 After minimization, the distance between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen atom of *p*ABA was  
202 measured (table 2). The distance after minimization increases slightly for all systems except for *vagegs*.  
203 After minimization, this distance was high for the *vSAKAA* system (5.6 Å), whereas the distance was  
204 3.3 Å before minimization, resulting in a high energy barrier (81.7 kcal/mol) (figure 10).

205 Reaction occurs for each system with a barrier of 23.8 kcal/mol and 27.5 kcal/mol for the *vagegs* and  
206 *vagKAA* systems, respectively. The product obtained corresponds to DHP.

**Table 2. Distance between the C9 atom of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate and the nitrogen atom of *p*-aminobenzoic acid, measured before reaction and barrier.**

	Initial distance (Å)	Intermediate state energy (kcal/mol)	Product energy (kcal/mol)
<b>WT</b>	3.6	29.7	-8.6
<b>ISgKAA</b>	3.8	38.8	0.3
<b>lagKAA</b>	3.3	41.1	10.0
<b>vSAKAA</b>	5.6	81.7	25.6
<b>vagKAA</b>	3.2	27.5	-8.5
<b>vagKgs</b>	3.1	35.4	0.1
<b>ISgegA</b>	4.2	36.0	-4.1
<b>vagegs</b>	2.9	23.8	-14.3

207



**Figure 10.** Reaction according to a SN2 mechanism. A hydrogen atom from *p*A<sub>BA</sub> was artificially removed. The resulting product is DHP.

## 209 **Discussion**

210 Previous experimental data suggest that the reaction catalyzed by DHPS follows a SN1 mechanism. Yun  
211 *et al.* identified a crystal structure of the enzyme and ligands in an intermediate state, in which the  
212 bond between DHPPP and the pyrophosphate group had been broken, but the product had not yet  
213 been formed. They corroborated this observation with a computational study. A stable intermediate  
214 after C-O bond cleavage in DHPP was obtained, and the barrier to bond breaking was only of 24 kcal/mol  
215 (6). Then, Chotpatiwetchkul *et al.*, based on their QM/MM calculations with DHPS of *Yersina pestis*,  
216 identified a SN1 mechanism as the most probable pathway (7). In our study, the SN1 mechanism test  
217 was inconclusive, suggesting that pyrophosphate alone is not stable and seeks to reform an  
218 interaction. We make the assumption that it can be stabilized by capturing hydrogen from its  
219 environment, for example from the residues Ser435 or Lys609, or from the ligand themselves. These  
220 hypotheses are currently being investigated.

221 The SN2 mechanism was favored in this work. However, the product obtained is not stable due to the  
222 presence of an excess hydrogen atom. At this stage, we can hypothesize that the stabilization of this  
223 product occurs when the excess hydrogen atom leaves, somewhere in its environment, but its location  
224 has not yet been determined.

225 The hypothesis that this hydrogen leaves before the reaction was also studied. Numerous unsuccessful  
226 attempts were made, notably involving Lys609 based on the work of Chotpatiwetchkul *et al.* (7). The  
227 initial results were encouraging, but could not be reproduced using other starting structures.

228 The artificial removal of this hydrogen from *pABA* made it possible to compare the different systems  
229 with each other. The system with the isolated presence of the Ile431Val mutation (vSAKAA), which has  
230 never been described in epidemiological studies to date (20), has a higher energy barrier than the other  
231 seven systems, which constitutes an interesting path to investigate. On the contrary, the reaction  
232 seems to be possible in all other mutant systems.

233 However, this work is preliminary and exploratory, and the calculations need to be repeated and  
234 refined. Extensive work is now being carried out.

## 235 **Acknowledgments**

236 We thank the CALMIP mesocenter, where the simulations were performed using HPC resources (grant  
237 P1237).

## 238 Author Contributions

239 Conceptualization & project administration: MB; Methodology: AB, and MB; Molecular dynamic  
240 simulations: EG; Data Analysis: EG, MB, SM; Draft preparation: EG and MB; All authors read and  
241 approved the final version of the manuscript.

## 242 References

- 243 1. WHO, World malaria report 2024. (2024). Available at: [https://www.who.int/teams/global-](https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024)  
244 [malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024](https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024).
- 245 2. S. J. Rogerson, *et al.*, Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for  
246 an old problem. *Lancet Infect Dis* **18**, e107–e118 (2018).
- 247 3. P. Chitnumsub, *et al.*, The structure of *Plasmodium falciparum* hydroxymethyldihydropterin  
248 pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase reveals the basis of sulfa resistance. *FEBS J* **287**,  
249 3273–3297 (2020).
- 250 4. A. M. Baca, R. Sirawaraporn, S. Turley, W. Sirawaraporn, W. G. Hol, Crystal structure of  
251 *Mycobacterium tuberculosis* 7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin  
252 monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J Mol Biol* **302**,  
253 1193–1212 (2000).
- 254 5. K. Babaoglu, J. Qi, R. E. Lee, S. W. White, Crystal structure of 7,8-dihydropteroate synthase from  
255 *Bacillus anthracis*: mechanism and novel inhibitor design. *Structure* **12**, 1705–1717 (2004).
- 256 6. M.-K. Yun, *et al.*, Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science* **335**,  
257 1110–1114 (2012).
- 258 7. W. Chotpatiwetchkul, K. Boonyarattanakalin, D. Gleeson, M. P. Gleeson, Exploring the catalytic  
259 mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and  
260 inhibitor. *Org Biomol Chem* **15**, 5593–5601 (2017).
- 261 8. E. Guémas, *et al.*, Deciphering the impact of mutations on PfDHPS active site and sulfadoxine  
262 binding: structural insights from molecular dynamics simulations. *Molecules* **30**, 4118 (2025).
- 263 9. M. Yogavel, *et al.*, Structure of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase-  
264 dihydropteroate synthase from *Plasmodium vivax* sheds light on drug resistance. *J Biol Chem* **293**,  
265 14962–14972 (2018).
- 266 10. M. C. Oguike, *et al.*, Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in  
267 *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the regional emergence of dhps 431V. *Int J Parasitol Drugs*  
268 *Drug Resist* **6**, 220–229 (2016).
- 269 11. J. A. Maier, *et al.*, ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters  
270 from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
- 271 12. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, Development and testing of a general  
272 amber force field. *J Comput Chem* **25**, 1157–1174 (2004).

- 273 13. J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, Antechamber: an accessory software package for  
274 molecular mechanical calculations. *J. Am. Chem. Soc* **222** (2001).
- 275 14. P. Mark, L. Nilsson, Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K.  
276 *J. Phys. Chem. A* **105**, 9954–9960 (2001).
- 277 15. M. Ester, H.-P. Kriegel, J. Sander, X. Xu, A density-based algorithm for discovering clusters in large  
278 spatial databases with noise in *Proceedings of the Second International Conference on Knowledge  
279 Discovery and Data Mining, KDD'96.*, (AAAI Press, 1996), pp. 226–231.
- 280 16. W. Rc, C. Mf, C. Da, The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in  
281 Amber. *Journal of computational chemistry* **29** (2008).
- 282 17. D. R. Roe, T. E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular  
283 dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput* **9**, 3084–3095 (2013).
- 284 18. W. L. DeLano, Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr* **40**,  
285 82–92 (2002).
- 286 19. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33–38, 27–  
287 28 (1996).
- 288 20. E. Guémas, *et al.*, Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with  
289 resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study. *The Lancet  
290 Microbe* **4**, e983–e993 (2023).

## Supporting Information

### Unravelling the Plasmodium falciparum DHPS catalytic mechanism through QM/MM dynamics

Emilie GUEMAS<sup>1,2,3,\*</sup>, Sandie MENARD<sup>2</sup>, Antoine BERRY<sup>2,3</sup>, Marie BRUT<sup>1</sup>

1. LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France
2. Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, CNRS UMR5051, INSERM UMR 1291, Toulouse, France
3. Service de Parasitologie et Mycologie, CHU Toulouse, Toulouse, France

\* corresponding author: guemas.e@chu-toulouse.fr

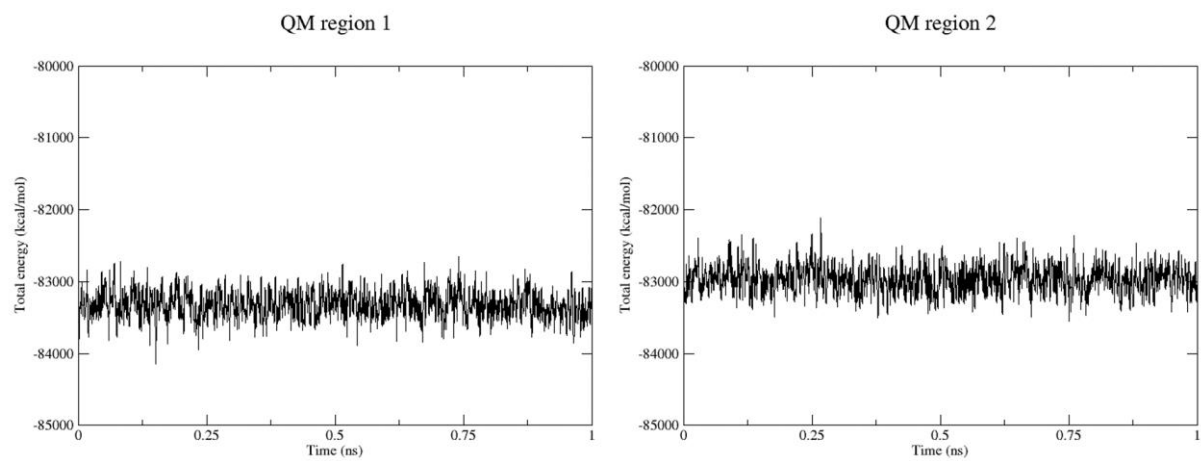
#### Supplementary Figures

**Figure S1.** Total energy profiles of the two *Pf*DHPS WT systems with different QM regions over 1 ns of molecular dynamics simulations.

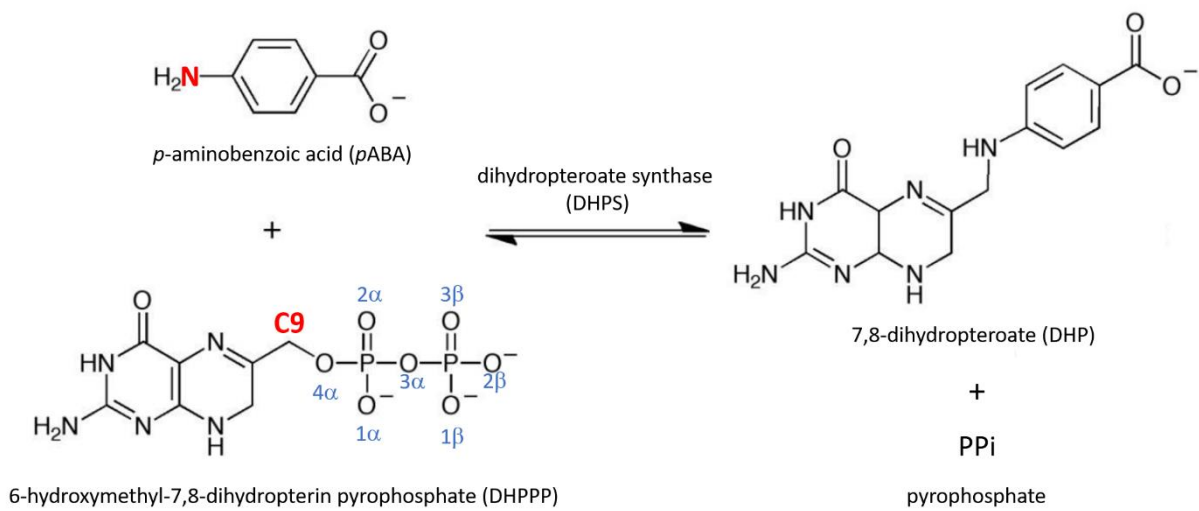
**Figure S2.** Reaction catalyzed by dihydropteroate synthase (DHPS).

**Figure S3.** Total energy profiles of the eight *Pf*DHPS systems over 1 ns of QM/MM simulations.

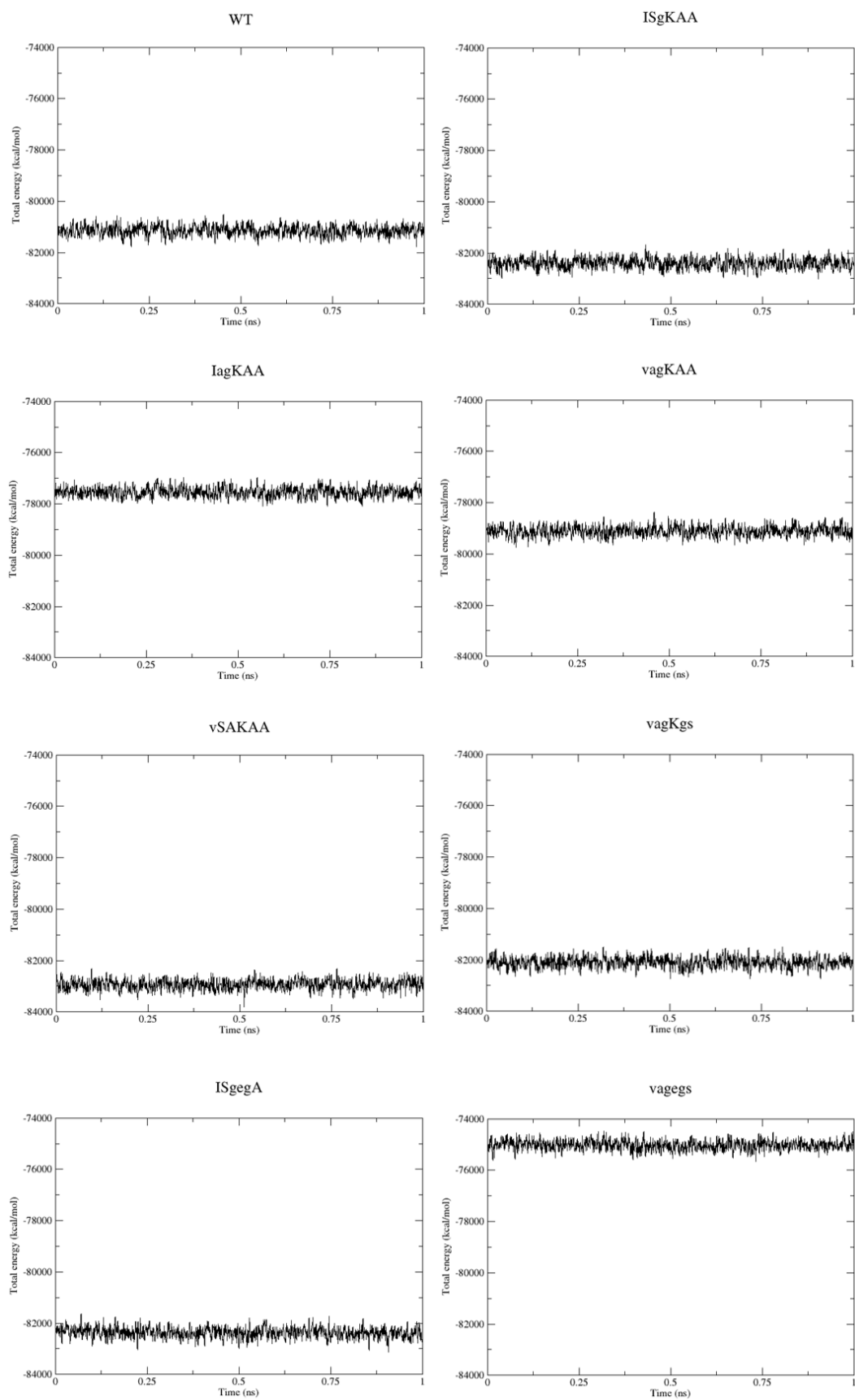
**Figure S4.** RMSD profiles of all *Pf*DHPS residues across the eight systems over 1 ns of QM/MM simulations.



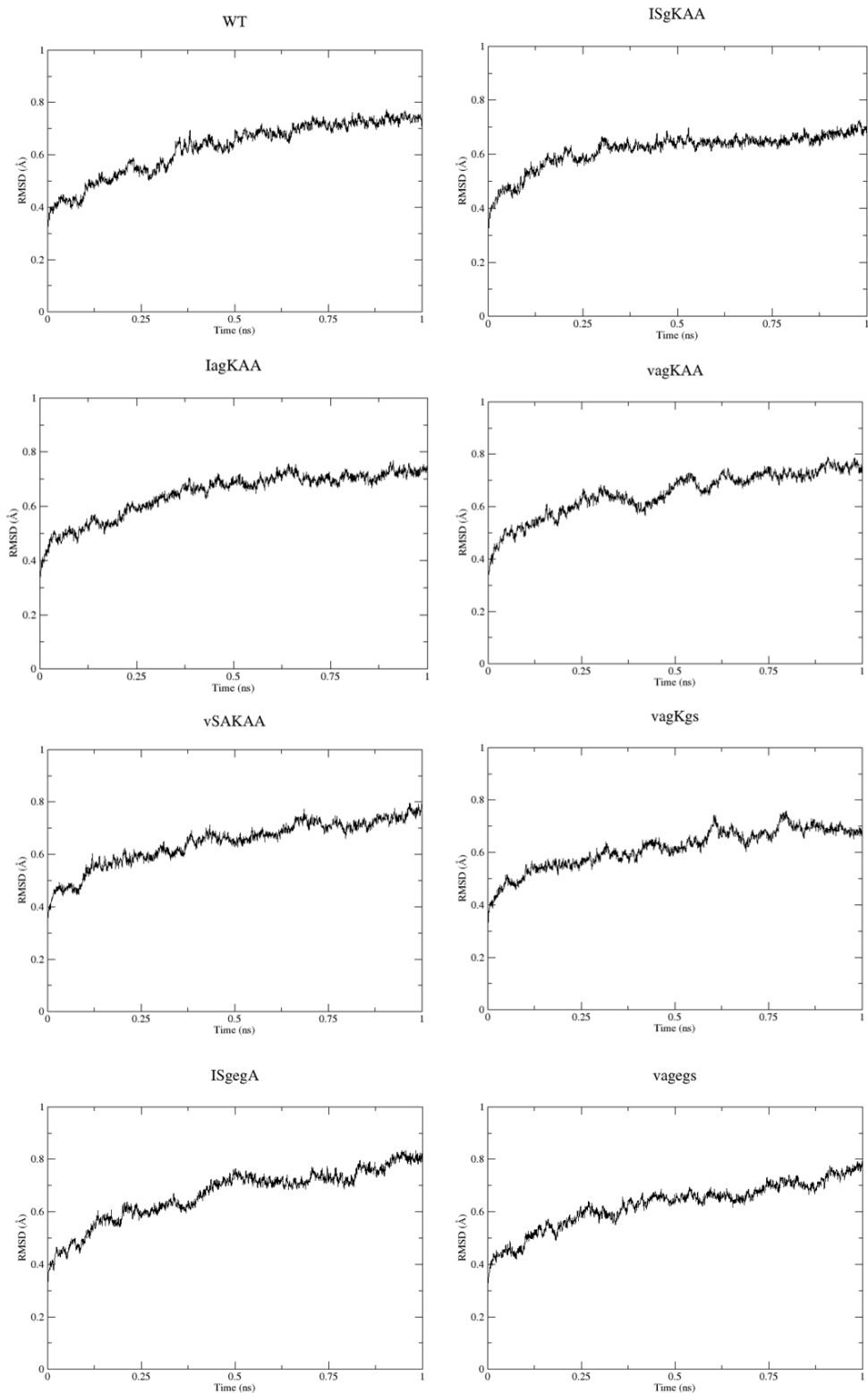
**Figure S1. Total energy profiles of the two *Pf*DHPS WT systems with different QM regions over 1 ns of molecular dynamics simulations.**



**Figure S2. Reaction catalyzed by dihydropteroate synthase (DHPS). DHPS catalyzes the formation of a covalent bond between the C9 atom of DHPPP and the nitrogen atom of *p*ABA.**



**Figure S3. Total energy profiles of the eight *PfDHPs* systems over 1 ns of QM/MM simulations.**



**Figure S4. RMSD profiles of all *PfDHPs* residues across the eight systems over 1 ns of QM/MM simulations.**

### 3. Discussion

Dans notre étude, le mécanisme réactionnel  $S_N1$ , privilégié par Yun *et al.* (281) et Chotpatiwetchkul *et al.* (288) n'a pas été concluant, en raison du manque de stabilité du pyrophosphate seul. De prochains travaux étudierons l'hypothèse d'une stabilisation du pyrophosphate par la capture d'hydrogène de son environnement. Les ligands (*pABA*), les résidus Ser435 ou Lys609 sont les hypothèses privilégiées à ce jour.

Le mécanisme  $S_N2$ , proposé par Baca *et al.* (286) et corroboré par les observations de Babaoglu *et al.* (287), a été celui que nous avons privilégié. L'exploration de ce mécanisme  $S_N2$  se poursuit afin d'élucider le manque de stabilité du produit obtenu en raison de la présence d'un atome d'hydrogène en excès. À ce stade, nous pouvons émettre l'hypothèse que la stabilisation de ce produit se produit lorsque l'atome d'hydrogène en excès quitte son environnement, mais son emplacement n'a pas encore été déterminé.

Le retrait d'un hydrogène du *pABA* est totalement artificiel mais nous a permis de comparer les différents systèmes entre eux. Le système présentant la mutation Ile431Val isolée (**vSAKAA**), qui n'a, à ce jour, jamais été décrite dans les études épidémiologiques, présente une barrière énergétique plus élevée que les autres systèmes. Cette observation est une première hypothèse pour expliquer que cet allèle ne soit pas retrouvé sur le terrain. De plus, notre modèle murin, a permis de mettre en évidence que la mutation Ile431Val isolée ne conférait pas de résistance à la sulfadoxine. Ainsi, le mutant **vSAKAA** ne présenterait d'avantage sélectif, ni avec le substrat naturel (*pABA*), ni avec l'inhibiteur (sulfadoxine).

Au contraire, la réaction semble possible dans tous les autres systèmes mutants, y compris le système porteur des 6 mutations (**vagegs**), jamais observé dans les travaux épidémiologiques, dont son hypothétique émergence pourrait compromettre un peu plus l'utilisation de la sulfadoxine.

Ces travaux exploratoires sont préliminaires. Les calculs doivent être répétés et affinés. Ils permettront ainsi d'obtenir de solides connaissances, indispensables pour la suite des travaux de repositionnement des sulfamides ou d'évaluation des potentiels nouveaux génotypes de résistance prédits.

## **Conclusion générale**

L'utilisation de la SP, en tant que chimioprophylaxie du paludisme pour les populations à risque, reste la bithérapie de choix. L'utilisation de la SP est, à ce jour, réservée au TPIg et à la SMC, ce qui limite la pression médicamenteuse et permet de prolonger son utilisation. Bien que l'association dihydroartémisine-pipéraquine ait montré des résultats satisfaisants pour la prévention du paludisme au cours de la grossesse, la propagation de la résistance à l'artémisinine ainsi que l'inertie lors de la modification des recommandations internationales sont des facteurs limitants à cette alternative.

Cependant, la SP, comme tous les antipaludiques, est menacée par la résistance. La surveillance épidémiologique, par la recherche des marqueurs moléculaires de résistance doit être exhaustive et ne pas se limiter à certaines mutations. La recherche de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS*, originaire d'Afrique et présente depuis au moins 30 ans, a longtemps été ignorée et négligée. De plus, le choix de la technologie utilisée a son importance. Les nouvelles technologies, telles que la technologie long read Pacific Biosciences, permettront des avancées majeures pour l'identification des allèles minoritaires, et entraîneront des modifications substantielles des données épidémiologiques. A ce jour, la fréquence du quintuple mutant **vagKgs** est très probablement sous-estimée.

L'évaluation de l'impact des allèles porteurs de la mutation Ile431Val de la *PfDHPS* sur la chimioprophylaxie des femmes enceintes et des jeunes enfants est importante et doit être réalisée. La sur-représentation de ce quintuple mutant **vagKgs** chez les femmes enceintes atteintes de paludisme ayant reçu un TPIg par SP est un premier argument pour un avantage sélectif de cet allèle conféré par une résistance à la sulfadoxine. Les prochains travaux, à l'aide des modèles *in vivo* et *in vitro* développés, permettront d'étayer cette hypothèse.

Une fois ces données épidémiologiques déterminées, la compréhension des mécanismes d'action des antipaludiques et de résistance mis en jeu par le parasite sont indispensables. L'obtention d'un système complet, équilibré et stable de la *PfDHPS* permet la description de la structure atomique de la *PfDHPS*, à l'échelle de l'angström. La mise en évidence de la réorganisation substantielle du site actif du quintuple mutant **vagKgs** est un prérequis indispensable pour permettre le développement de nouvelles options de traitement, par repositionnement d'anciennes molécules appartenant aux sulfamides ou par screening de larges bases de molécules. Puis, ces connaissances fondamentales des aspects structuraux de l'enzyme pourraient permettre d'anticiper l'émergence de nouvelles mutations.

Enfin, les travaux concernant le mécanisme réactionnel et l'implication des mutations de la *PfDHPS* sur les aspects fonctionnels de l'enzyme fournissent des premières hypothèses permettant d'expliquer que la mutation Ile431Val ne soit pas retrouvée de manière isolée, alors que la propagation de l'enzyme *PfDHPS* porteuse de 6 mutations (Ile431Val, Ser436Ala, Ala437Gly, Lys540Glu, Ala581Gly et Ala613Ser), jamais décrite à ce jour, semble possible. Cela compromettrait encore un peu plus l'utilisation de la sulfadoxine. L'évaluation de nouveaux antipaludiques, de vaccins ou d'anticorps monoclonaux pouvant remplacer ou compléter l'action de la SP, afin d'offrir une protection complète contre les effets du paludisme dans les populations à risque est indispensable.

## Références bibliographiques

1. C. L. Laveran, A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria. *Rev Infect Dis* **4**, 908–911 (1982).
2. M. Simonet, Alphonse Laveran, le premier lauréat français du Prix Nobel de physiologie/médecine. *Revue de Biologie médicale* 49–59 (2020).
3. F. E. Cox, History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* **3**, 5 (2010).
4. Z. Hawass, *et al.*, Ancestry and pathology in King Tutankhamun’s family. *JAMA* **303**, 638–647 (2010).
5. WHO, World malaria report 2024. (2024). Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024>.
6. C. J. Sutherland, *et al.*, Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis* **201**, 1544–1550 (2010).
7. J. R. Poespoprodjo, N. M. Douglas, D. Ansong, S. Kho, N. M. Anstey, Malaria. *The Lancet* **402**, 2328–2345 (2023).
8. WHO, WHO guidelines for malaria. (2024). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria> [Accessed 16 January 2025].
9. X. Su, L. H. Miller, The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci* **58**, 1175–1179 (2015).
10. D. L. Doolan, C. Dobaño, J. K. Baird, Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* **22**, 13–36, Table of Contents (2009).
11. G. A. Roth, *et al.*, Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1736–1788 (2018).
12. Integrated African Health Observatory, WHO, Résumé analytique : Quelles sont les principales causes de mortalité dans la région africaine ? (2023). Available at: [https://files.aho.afro.who.int/afahobckpcontainer/production/files/iAHO\\_Mortality\\_Regional-Factsheet-FR.pdf](https://files.aho.afro.who.int/afahobckpcontainer/production/files/iAHO_Mortality_Regional-Factsheet-FR.pdf) [Accessed 15 January 2025].
13. A. Salanti, *et al.*, Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med* **200**, 1197–1203 (2004).
14. M. Fried, P. E. Duffy, Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**, 1502–1504 (1996).
15. L. Sharma, G. Shukla, Placental malaria: a new insight into the pathophysiology. *Front Med (Lausanne)* **4**, 117 (2017).

16. M. Fried, F. Nosten, A. Brockman, B. J. Brabin, P. E. Duffy, Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**, 851–852 (1998).
17. M. Desai, *et al.*, Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* **7**, 93–104 (2007).
18. S. Nema, R. Singhal, P. K. Bharti, N. Nitika, Malaria in pregnancy and its potential impact on neurodevelopment in children: a systematic review. *Pediatr Res* (2025). <https://doi.org/10.1038/s41390-025-03967-5>.
19. P. Saenger, P. Czernichow, I. Hughes, E. O. Reiter, Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* **28**, 219–251 (2007).
20. E. M. Lundgren, T. Tuvemo, Effects of being born small for gestational age on long-term intellectual performance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**, 477–488 (2008).
21. P. Garner, B. Brabin, A review of randomized controlled trials of routine antimalarial drug prophylaxis during pregnancy in endemic malarious areas. *Bull World Health Organ* **72**, 89–99 (1994).
22. RTS,S Clinical Trials Partnership, Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**, 31–45 (2015).
23. M. S. Dattoo, *et al.*, Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in African children: a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* **403**, 533–544 (2024).
24. WHO, Advances in malaria chemotherapy. Report of a WHO scientific group. (1984). Available at: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/40173/WHO\\_TRS\\_711\\_%28part1%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/40173/WHO_TRS_711_%28part1%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y) [Accessed 12 May 2025].
25. S. B. Sirima, *et al.*, Failure of a chloroquine chemoprophylaxis program to adequately prevent malaria during pregnancy in Koupéla District, Burkina Faso. *Clin Infect Dis* **36**, 1374–1382 (2003).
26. L. J. Schultz, *et al.*, The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **51**, 515–522 (1994).
27. M. E. Parise, *et al.*, Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. (1998). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.813>.
28. WHO, WHO Expert Committee on Malaria : twentieth report. (2000). Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/42247> [Accessed 16 January 2025].

29. D. Radeva-Petrova, K. Kayentao, F. O. ter Kuile, D. Sinclair, P. Garner, Drugs for preventing malaria in pregnant women in endemic areas: any drug regimen versus placebo or no treatment. *Cochrane Database Syst Rev* **2014**, CD000169 (2014).
30. K. Kayentao, *et al.*, Intermittent preventive therapy for malaria during pregnancy using 2 vs 3 or more doses of sulfadoxine-pyrimethamine and risk of low birth weight in Africa: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **309**, 594–604 (2013).
31. WHO, WHO policy brief for the implementation of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy using sulfadoxine-pyrimethamine (IPTp-SP). (2014). Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HTM-GMP-2014.4>.
32. E. Sicuri, *et al.*, Cost-effectiveness of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy in southern Mozambique. *PLOS ONE* **5**, e13407 (2010).
33. P. J. Peters, M. C. Thigpen, M. E. Parise, R. D. Newman, Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf* **30**, 481–501 (2007).
34. ANSM, Résumé des caractéristiques du produit : FANSIDAR. (2011). Available at: <https://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0201484.htm> [Accessed 24 January 2025].
35. H. Blencowe, S. Cousens, B. Modell, J. Lawn, Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* **39**, i110–i121 (2010).
36. A. Nzila, J. Okombo, A. M. Molloy, Impact of folate supplementation on the efficacy of sulfadoxine/pyrimethamine in preventing malaria in pregnancy: the potential of 5-methyl-tetrahydrofolate. *J Antimicrob Chemother* **69**, 323–330 (2014).
37. S. Hernández-Díaz, M. M. Werler, A. M. Walker, A. A. Mitchell, Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* **343**, 1608–1614 (2000).
38. T. E. Kwenti, Malaria and HIV coinfection in sub-Saharan Africa: prevalence, impact, and treatment strategies. *Res Rep Trop Med* **9**, 123–136 (2018).
39. A. B. Suthar, *et al.*, Co-trimoxazole prophylaxis in adults, including pregnant women, with HIV: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV* **2**, e137-150 (2015).
40. R. R. D. Nana, *et al.*, Intermittent preventive treatment with sulfadoxine pyrimethamine for malaria: a global overview and challenges affecting optimal drug uptake in pregnant women. *Pathog Glob Health* **117**, 462–475 (2023).
41. O. Sangho, *et al.*, Determinants of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in pregnant women (IPTp-SP) in Mali, a household survey. *Malar J* **20**, 231 (2021).
42. S. Amankwah, F. Anto, Factors Associated with uptake of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a cross-sectional study in private health facilities in Tema Metropolis, Ghana. *J Trop Med* **2019**, 9278432 (2019).

43. O. Nkoka, T.-W. Chuang, Y.-H. Chen, Association between timing and number of antenatal care visits on uptake of intermittent preventive treatment for malaria during pregnancy among Malawian women. *Malaria Journal* **17**, 211 (2018).
44. W. M. Mchwampaka, *et al.*, Factors affecting uptake of  $\geq 3$  doses of Sulfadoxine-Pyrimethamine for malaria prevention in pregnancy in selected health facilities, Arusha region, Tanzania. *BMC Pregnancy Childbirth* **19**, 440 (2019).
45. N. H. Diengou, *et al.*, Factors associated with the uptake of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy in the Bamenda health districts, Cameroon. *Pan Afr Med J* **35**, 42 (2020).
46. A. Figueroa-Romero, C. Pons-Duran, R. Gonzalez, Drugs for intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: current knowledge and way forward. *Trop Med Infect Dis* **7**, 152 (2022).
47. T. H. Divala, *et al.*, Chloroquine as weekly chemoprophylaxis or intermittent treatment to prevent malaria in pregnancy in Malawi: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **18**, 1097–1107 (2018).
48. C. A. Clerk, *et al.*, A Randomized, controlled trial of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, or the combination in pregnant women in Ghana. *The Journal of Infectious Diseases* **198**, 1202–1211 (2008).
49. R. González, *et al.*, Intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy with mefloquine in HIV-negative women: a multicentre randomized controlled trial. *PLoS Med* **11**, e1001733 (2014).
50. O. Akinyotu, F. Bello, R. Abdus-Salam, A. Arowojolu, A randomized controlled trial of azithromycin and sulphadoxine-pyrimethamine as prophylaxis against malaria in pregnancy among human immunodeficiency virus-positive women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **113**, 463–470 (2019).
51. A. Kakuru, *et al.*, Dihydroartemisinin-Piperaquine for the prevention of malaria in pregnancy. *N Engl J Med* **374**, 928–939 (2016).
52. R. Kajubi, *et al.*, Monthly sulfadoxine-pyrimethamine versus dihydroartemisinin-piperaquine for intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a double-blind, randomised, controlled, superiority trial. *Lancet* **393**, 1428–1439 (2019).
53. P. J. Rosenthal, *et al.*, The emergence of artemisinin partial resistance in Africa: how do we respond? *Lancet Infect Dis* **24**, e591–e600 (2024).
54. WHO, WHO policy recommendation: seasonal malaria chemoprevention (SMC) for *Plasmodium falciparum* malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa. (2012). Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/337978> [Accessed 17 January 2025].
55. WHO, Seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine–pyrimethamine plus amodiaquine in children: a field guide. (2023). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240073692> [Accessed 15 January 2025].

56. T. Masserey, T. Lee, S. L. Kelly, I. M. Hastings, M. A. Penny, Seasonal malaria chemoprevention and the spread of *Plasmodium falciparum* quintuple-mutant parasites resistant to sulfadoxine–pyrimethamine: a modelling study. *The Lancet Microbe* **5** (2024).
57. C. Gilmartin, *et al.*, Seasonal malaria chemoprevention in the Sahel subregion of Africa: a cost-effectiveness and cost-savings analysis. *Lancet Glob Health* **9**, e199–e208 (2021).
58. M. M. Meremikwu, S. Donegan, D. Sinclair, E. Esu, C. Oringanje, Intermittent preventive treatment for malaria in children living in areas with seasonal transmission. *Cochrane Database Syst Rev* **2012**, CD003756 (2012).
59. ACCESS-SMC Partnership, Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and central Africa: an observational study. *Lancet* **396**, 1829–1840 (2020).
60. D. Issiaka, *et al.*, Impact of seasonal malaria chemoprevention on hospital admissions and mortality in children under 5 years of age in Ouelessebouyou, Mali. *Malar J* **19**, 103 (2020).
61. K. Diarra, B. Dembele, A. Ouattara, I. Simporé, Seasonal malaria chemoprevention in children aged 3–59 months in Mali: parents’ perceptions, attitudes and beliefs regarding drug administration. *BMC Public Health* **25**, 1341 (2025).
62. R. C. K. Tine, *et al.*, Feasibility, safety and effectiveness of combining home based malaria management and seasonal malaria chemoprevention in children less than 10 years in Senegal: a cluster-randomised trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **108**, 13–21 (2014).
63. J. L. A. Ndiaye, *et al.*, Seasonal malaria chemoprevention combined with community case management of malaria in children under 10 years of age, over 5 months, in south-east Senegal: A cluster-randomised trial. *PLoS Med* **16**, e1002762 (2019).
64. J. L. A. Ndiaye, *et al.*, Seasonal malaria chemoprevention combined with community case management of malaria in children under 10 years of age, over 5 months, in south-east Senegal: A cluster-randomised trial. *PLoS Med* **16**, e1002762 (2019).
65. J. Thwing, J. Williamson, I. Cavros, J. R. Gutman, Systematic review and meta-analysis of seasonal malaria chemoprevention. *Am J Trop Med Hyg* **110**, 20–31 (2024).
66. K. B. Beshir, *et al.*, Prevalence of *Plasmodium falciparum* haplotypes associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine and amodiaquine before and after upscaling of seasonal malaria chemoprevention in seven African countries: a genomic surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases* (2022).
67. K. P. Asante, *et al.*, Feasibility, safety, and impact of the RTS,S/AS01E malaria vaccine when implemented through national immunisation programmes: evaluation of cluster-randomised introduction of the vaccine in Ghana, Kenya, and Malawi. *Lancet* **403**, 1660–1670 (2024).
68. R. Guyon, *et al.*, Core-shell microcapsules compatible with routine injection enable prime/boost immunization against malaria with a single shot. *Sci Transl Med* **17**, eadw2256 (2025).

69. D. Chandramohan, *et al.*, Seasonal malaria vaccination with or without seasonal malaria chemoprevention. *N Engl J Med* **385**, 1005–1017 (2021).
70. A. Dicko, *et al.*, Seasonal vaccination with RTS,S/AS01E vaccine with or without seasonal malaria chemoprevention in children up to the age of 5 years in Burkina Faso and Mali: a double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* **24**, 75–86 (2024).
71. A. Chêne, *et al.*, Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. *Malar J* **15**, 476 (2016).
72. B. Mordmüller, *et al.*, First-in-human, Randomized, Double-blind Clinical Trial of Differentially Adjuvanted PAMVAC, A Vaccine Candidate to Prevent Pregnancy-associated Malaria. *Clin Infect Dis* **69**, 1509–1516 (2019).
73. S. B. Sirima, *et al.*, PRIMVAC vaccine adjuvanted with Alhydrogel or GLA-SE to prevent placental malaria: a first-in-human, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Infect Dis* **20**, 585–597 (2020).
74. L. Wills, Treatment of pernicious anaemia of pregnancy and tropical anaemia. *Br Med J* **1**, 1059–1064 (1931).
75. H. K. Mitchell, E. E. Snell, R. J. Williams, The concentration of “folic acid.” *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 2284–2284 (1941).
76. R. B. Angier, *et al.*, Synthesis of a compound identical with the *L. casei* factor isolated from liver. *Science* **102**, 227–228 (1945).
77. A. V. Hoffbrand, D. G. Weir, The history of folic acid. *Br J Haematol* **113**, 579–589 (2001).
78. F. Rébeillé, *et al.*, Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum* **126**, 330–342 (2006).
79. M. Lucock, Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolism* **71**, 121–138 (2000).
80. E. A. Cossins, L. Chen, Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* **45**, 437–452 (1997).
81. J. E. Hyde, Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* **94**, 191–206 (2005).
82. A. Pribat, *et al.*, 6-Pyruvoyltetrahydropterin synthase paralogs replace the folate synthesis enzyme dihydroneopterin aldolase in diverse bacteria. *J Bacteriol* **191**, 4158–4165 (2009).
83. S. Dittrich, *et al.*, An atypical orthologue of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase can provide the missing link in the folate biosynthesis pathway of malaria parasites. *Mol Microbiol* **67**, 609–618 (2008).

84. F. Rébeillé, D. Macherel, J. M. Mouillon, J. Garin, R. Douce, Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *EMBO J* **16**, 947–957 (1997).
85. K. M. Ivanetich, D. V. Santi, Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J* **4**, 1591–1597 (1990).
86. J.-M. Mouillon, S. Ravanel, R. Douce, F. Rébeillé, Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *Biochemical Journal* **363**, 313–319 (2002).
87. F. Roberts, *et al.*, Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* **393**, 801–805 (1998).
88. Y.-N. Dai, *et al.*, Structure and Catalytic Mechanism of Yeast 4-Amino-4-deoxychorismate Lyase\*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 22985–22992 (2013).
89. G. J. C. Basset, *et al.*, Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1496–1501 (2004).
90. F. Hawking, Milk, p-aminobenzoate, and malaria of rats and monkeys. *Br Med J* **1**, 425–429 (1954).
91. G. A. Kicska, L.-M. Ting, V. L. Schramm, K. Kim, Effect of dietary p-aminobenzoic acid on murine *Plasmodium yoelii* infection. *J Infect Dis* **188**, 1776–1781 (2003).
92. R. S. Bray, P. C. C. Garnham, Effect of milk diet on *P. cynomolgi* infections in monkeys. *Br Med J* **1**, 1200–1201 (1953).
93. W. Kretschmar, [The importance of p-aminobenzoic acid to the course and immunity of malaria in animals (*Plasmodium berghei*) and in man (*Pl. falciparum*). 3. Studies on children experimentally fed on milk]. *Z Tropenmed Parasitol* **17**, 375–390 (1966).
94. J. J. McGuire, J. R. Bertino, Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates. *Mol Cell Biochem* **38 Spec No**, 19–48 (1981).
95. J. Geisel, Folic acid and neural tube defects in pregnancy: a review. *J Perinat Neonatal Nurs* **17**, 268–279 (2003).
96. J. Krungkrai, H. K. Webster, Y. Yuthavong, De novo and salvage biosynthesis of pteroylpentaglutamates in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **32**, 25–37 (1989).
97. P. Wang, R. K. Brobey, T. Horii, P. F. Sims, J. E. Hyde, Utilization of exogenous folate in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its critical role in antifolate drug synergy. *Mol Microbiol* **32**, 1254–1262 (1999).
98. P. Wang, M. Read, P. F. Sims, J. E. Hyde, Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate

- synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol* **23**, 979–986 (1997).
99. W. M. Watkins, D. G. Sixsmith, J. D. Chulay, H. C. Spencer, Antagonism of sulfadoxine and pyrimethamine antimalarial activity in vitro by p-aminobenzoic acid, p-aminobenzoylglutamic acid and folic acid. *Mol Biochem Parasitol* **14**, 55–61 (1985).
  100. P. Tan-ariya, C. R. Brockelman, C. Menabandhu, Optimal concentration of p-aminobenzoic acid and folic acid in the in vitro assay of antifolates against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **37**, 42–48 (1987).
  101. R. L. Jacobs, Role of p-aminobenzoic acid in *Plasmodium berghei* infection in the mouse. *Experimental Parasitology* **15**, 213–225 (1964).
  102. J. E. Salcedo-Sora, *et al.*, The molecular basis of folate salvage in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **286**, 44659–44668 (2011).
  103. D. Richard, C. Kündig, M. Ouellette, A new type of high affinity folic acid transporter in the protozoan parasite *Leishmania* and deletion of its gene in methotrexate-resistant cells. *J Biol Chem* **277**, 29460–29467 (2002).
  104. R. Hannisdal, P. M. Ueland, A. Svardal, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of folate and folate catabolites in human serum. *Clin Chem* **55**, 1147–1154 (2009).
  105. P. Wang, Q. Wang, P. F. G. Sims, J. E. Hyde, Characterisation of exogenous folate transport in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **154**, 40–51 (2007).
  106. A. Nzila, *et al.*, Chemosensitization of *Plasmodium falciparum* by probenecid in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2108–2112 (2003).
  107. A. Sowunmi, *et al.*, Open randomized study of pyrimethamine-sulphadoxine vs. pyrimethamine-sulphadoxine plus probenecid for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Trop Med Int Health* **9**, 606–614 (2004).
  108. C. V. Plowe, J. G. Kublin, O. K. Doumbo, *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resist Updat* **1**, 389–396 (1998).
  109. A. D. Hanson, S. Roje, One-carbon metabolism in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 119–137 (2001).
  110. S. Maenpuen, K. Sopitthummakun, Y. Yuthavong, P. Chaiyen, U. Leartsakulpanich, Characterization of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase—A potential antimalarial target. *Molecular and Biochemical Parasitology* **168**, 63–73 (2009).
  111. M. Read, I. B. Müller, S. L. Mitchell, P. F. G. Sims, J. E. Hyde, Dynamic subcellular localization of isoforms of the folate pathway enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT) through the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **9**, 351 (2010).

112. I. B. Müller, J. E. Hyde, Folate metabolism in human malaria parasites—75 years on. *Molecular and Biochemical Parasitology* **188**, 63–77 (2013).
113. T. Forges, *et al.*, Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* **13**, 225–238 (2007).
114. F. H. Nazki, A. S. Sameer, B. A. Ganaie, Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* **533**, 11–20 (2014).
115. Y.-I. Kim, Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutrition Reviews* **58**, 205–209 (2000).
116. A. L. Luhby, J. M. Cooperman, D. N. Teller, Urinary excretion of formiminoglutamic acid: application in diagnosis of clinical folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* **7**, 397–406 (1959).
117. J. D. Chulay, W. M. Watkins, D. G. Sixsmith, Synergistic antimalarial activity of pyrimethamine and sulfadoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* **33**, 325–330 (1984).
118. T. Triglia, J. G. Menting, C. Wilson, A. F. Cowman, Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13944–13949 (1997).
119. G. Domagk, [A Contribution to Chemotherapy of Bacterial Infections]. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **61**, 250–253 (1935).
120. J. Trefouel, F. Nitti, D. Bovet, Activité du para-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. 756 (1935).
121. K. E. Birkhaug, Bacteriostatic Effect of Sulfapyridine, Sulfanilamide and Prontosil Rubrum in vitro on Mycobacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **42**, 275–277 (1939).
122. E. Fromm, J. Wittmann, Derivate des p-Nitrothiophenols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **41**, 2264–2273 (1908).
123. G. H. Faget, R. C. Pogge, Present status of promin treatment in leprosy. *Int J Lepr* **14**, 30–36 (1946).
124. G. M. Brown, The Biosynthesis of Folic Acid: II. inhibition by sulfoamides. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 536–540 (1962).
125. D. I. Hammoudeh, Y. Zhao, S. W. White, R. E. Lee, Replacing sulfa drugs with novel DHPS inhibitors. *Future Med Chem* **5**, 10.4155/fmc.13.97 (2013).
126. C. E. J. Johnson, Status of sulfonamide therapy in malaria. *American Journal of Medical Sciences* **206**, 327–36 (1943).

127. L. Bock, G. H. Miller, K. J. Schaper, J. K. Seydel, Sulfonamide structure-activity relations in a cell-free system. 2. Proof for the formation of a sulfonamide-containing folate analog. *J. Med. Chem.* **17**, 23–28 (1974).
128. G. Swedberg, S. Castensson, O. Sköld, Characterization of mutationally altered dihydropteroate synthase and its ability to form a sulfonamide-containing dihydrofolate analog. *J Bacteriol* **137**, 129–136 (1979).
129. S. Roland, R. Ferone, R. J. Harvey, V. L. Styles, R. W. Morrison, The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase. *J Biol Chem* **254**, 10337–10345 (1979).
130. O. Patel, *et al.*, Inhibition studies of sulfonamide-containing folate analogs in yeast. *Microb Drug Resist* **9**, 139–146 (2003).
131. J. K. Seydel, M. Richter, E. Wempe, Mechanism of action of the folate blocker diaminodiphenylsulfone (dapson, DDS) studied in *E. coli* cell-free enzyme extracts in comparison to sulfonamides (SA). *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **48**, 18–29 (1980).
132. O. G. Patel, E. K. Mberu, A. M. Nzila, I. G. Macreadie, Sulfa drugs strike more than once. *Trends in Parasitology* **20**, 1–3 (2004).
133. K. T. Rios, T. M. Dickson, S. E. Lindner, Standard Selection Treatments with Sulfadiazine Limit Plasmodium yoelii Host-to-Vector Transmission. *mSphere* **7**, e00106-22.
134. D. L. Wright, A. C. Anderson, Antifolate Agents: A Patent Review (2006–2010). *Expert Opin Ther Pat* **21**, 1293–1308 (2011).
135. B. L. Hutchings, *et al.*, Pteroylaspartic acid, an antagonist for pteroylglutamic acid. *Journal of Biological Chemistry* **170**, 323–328 (1947).
136. S. Farber, L. K. Diamond, Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* **238**, 787–793 (1948).
137. R. Gubner, S. August, V. Ginsberg, Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci* **221**, 176–182 (1951).
138. M. V. Raimondi, *et al.*, DHFR Inhibitors: reading the past for discovering novel anticancer agents. *Molecules* **24**, 1140 (2019).
139. R. Kent, B. Huber, Gertrude Belle Elion (1918-99). *Nature* **398**, 380 (1999).
140. H. M. Archibald, Preliminary field trials on a new schizonticide. *Br Med J* **2**, 821–823 (1951).
141. F. H. S. Curd, D. G. Davey, F. L. Rose, Studies on synthetic antimalarial drugs; some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Ann Trop Med Parasitol* **39**, 208–216 (1945).

142. H. C. Carrington, A. F. Crowther, D. G. Davey, A. A. Levi, F. L. Rose, A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nature* **168**, 1080 (1951).
143. WHO, Résistance des parasites du paludisme aux médicaments : rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. (1965). Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/37548> [Accessed 20 January 2025].
144. D. B. Jelliffe, Relative pyrimethamine insensitivity in a case of *falciparum* malaria in Jamaica. *J Trop Med Hyg* **56**, 201–202 (1953).
145. D. F. Clyde, G. T. Shute, Resistance of East African varieties of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **48**, 495–500 (1954).
146. K. E. Dixon, R. G. Williams, T. Pongsupat, U. Pitaktong, P. Phintuyothin, A comparative trial of Mefloquine and Fansidar in the treatment of *falciparum* malaria: Failure of Fansidar. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **76**, 664–667 (1982).
147. WHO, Stratégies d'utilisation des antipaludiques: Besoins de données, traitement du paludisme non compliqué et prise en charge du paludisme pendant la grossesse. (1994). Available at: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/59532/WHO\\_MAL\\_94.1070\\_fre.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/59532/WHO_MAL_94.1070_fre.pdf?sequence=1).
148. S. Gesase, *et al.*, High resistance of *Plasmodium falciparum* to sulphadoxine/pyrimethamine in northern Tanzania and the emergence of dhps resistance mutation at Codon 581. *PLoS One* **4**, e4569 (2009).
149. WHO, Ministère de la Santé et de la Protection sociale, République-Unie de Tanzanie. Lignes directrices nationales pour le diagnostic et le traitement du paludisme. (2006).
150. A. A. Adeel, *et al.*, High efficacy of artemether-lumefantrine and declining efficacy of artesunate + sulfadoxine-pyrimethamine against *Plasmodium falciparum* in Sudan (2010–2015): evidence from in vivo and molecular marker studies. *Malar J* **15**, 285 (2016).
151. National Institute of malaria research, New Delhi, Guidelines for diagnosis and treatment of malaria in India. (2014).
152. M. Afsharpad, S. Zakeri, S. Pirahmadi, N. D. Djadid, Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs after adoption of sulfadoxine-pyrimethamine plus artesunate as the first line treatment in Iran. *Acta Trop* **121**, 13–18 (2012).
153. W. M. Atroosh, *et al.*, Sustained efficacy of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine against *Plasmodium falciparum* in Yemen and a renewed call for an adjunct single dose primaquine to clear gametocytes. *Malar J* **15**, 295 (2016).
154. WHO, Traitement préventif intermittent du nourrisson à la sulfadoxine-pyriméthamine (TPIIn-SP) pour lutter contre le paludisme en Afrique: Guide de la mise en œuvre sur le terrain. (2011). Available at: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/70807/WHO\\_IVB\\_11.07\\_fre.pdf?isAllowed](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/70807/WHO_IVB_11.07_fre.pdf?isAllowed)



168. Z. Zhou, *et al.*, Temporal trends in molecular markers of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in human blood and profiles of corresponding resistant markers in mosquito oocysts in Asembo, western Kenya. *Malar J* **21**, 265 (2022).
169. F. E. T. Bohissou, *et al.*, Evolution of *Pfdhps* and *Pfdhfr* mutations before and after adopting seasonal malaria chemoprevention in Nanoro, Burkina Faso. *Sci Rep* **14**, 24224 (2024).
170. P. V. K. Tchuenkam, *et al.*, *Plasmodium falciparum* dhps and dhfr markers of resistance to sulfadoxine–pyrimethamine five years (2016–2020) after the implementation of seasonal malaria chemoprevention in Cameroon. *Wellcome Open Res* **9**, 323 (2024).
171. N. W. Lucchi, *et al.*, Increasing prevalence of a novel triple-mutant dihydropteroate synthase genotype in *Plasmodium falciparum* in western Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 3995–4002 (2015).
172. F. Kateera, *et al.*, Molecular surveillance of *Plasmodium falciparum* drug resistance markers reveals partial recovery of Chloroquine susceptibility but sustained Sulfadoxine-Pyrimethamine resistance at two sites of different malaria transmission intensities in Rwanda. *Acta Trop* **164**, 329–336 (2016).
173. L. Zhao, *et al.*, Widespread resistance mutations to sulfadoxine-pyrimethamine in malaria parasites imported to China from Central and Western Africa. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **12**, 1–6 (2020).
174. E. R. Lozovsky, *et al.*, Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12025–12030 (2009).
175. F. Huang, *et al.*, Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province, China. *Malaria Journal* **11**, 243 (2012).
176. N. Mishra, *et al.*, Declining efficacy of artesunate plus sulphadoxine-pyrimethamine in northeastern India. *Malaria Journal* **13**, 284 (2014).
177. Y. Zhao, *et al.*, Genetic variations associated with drug resistance markers in asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Myanmar. *Genes* **10**, 692 (2019).
178. D. R. Brooks, *et al.*, Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry* **224**, 397–405 (1994).
179. T. Triglia, A. F. Cowman, Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7149–7153 (1994).
180. J. A. Djaman, A. Mazabraud, L. Basco, Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d’Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* **101**, 103–112 (2007).

181. N. C. Iriemenam, *et al.*, Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug-resistance molecular markers in *Plasmodium falciparum* parasites from pregnant women in western Kenya. *Malar J* **11**, 134 (2012).
182. V. Lumb, *et al.*, Emergence of an unusual sulfadoxine-pyrimethamine resistance pattern and a novel K540N mutation in dihydropteroate synthetase in *Plasmodium falciparum* isolates obtained from Car Nicobar Island, India, after the 2004 Tsunami. *J Infect Dis* **199**, 1064–1073 (2009).
183. B. K. Torrevillas, *et al.*, *Plasmodium falciparum* DHFR and DHPS mutations are associated with HIV-1 co-infection and a novel DHPS mutation I504T is identified in Western Kenya. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 600112 (2020).
184. M. Venkatesan, *et al.*, Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nat Commun* **14**, 4031 (2023).
185. E. M. Wise, M. M. Abou-Donia, Sulfonamide resistance mechanism in *Escherichia coli*: R plasmids can determine sulfonamide-resistant dihydropteroate synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2621–2625 (1975).
186. O. Sköld, R-factor-mediated resistance to sulfonamides by a plasmid-borne, drug-resistant dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother* **9**, 49–54 (1976).
187. G. Swedberg, O. Sköld, Characterization of different plasmid-borne dihydropteroate synthases mediating bacterial resistance to sulfonamides. *J Bacteriol* **142**, 1–7 (1980).
188. V. Perreten, P. Boerlin, A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1169–1172 (2003).
189. M. Razavi, *et al.*, Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome* **5**, 160 (2017).
190. R. J. Pearce, *et al.*, Multiple origins and regional dispersal of resistant *dhps* in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med* **6**, e1000055 (2009).
191. T. Jiang, *et al.*, High prevalence of *Pfdhfr*–*Pfdhps* quadruple mutations associated with sulfadoxine–pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J* **18**, 101 (2019).
192. C. J. Sutherland, *et al.*, Novel *pfdhps* haplotypes among imported cases of *Plasmodium falciparum* malaria in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3405–3410 (2009).
193. P. Chauvin, *et al.*, Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant *pfdhfr/pfdhps* alleles. *J Antimicrob Chemother* **70**, 2566–2571 (2015).
194. M. C. Oguike, *et al.*, Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Nigeria and the regional emergence of *dhps* 431V. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **6**, 220–229 (2016).

195. H. Quan, *et al.*, High multiple mutations of *Plasmodium falciparum* resistant genotypes to sulphadoxine-pyrimethamine in Lagos, Nigeria. *Infect Dis Poverty* **9**, 91 (2020).
196. A. M. Nzila, *et al.*, Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 991–996 (2000).
197. S. A. Omar, I. S. Adagu, D. W. Gump, N. P. Ndaru, D. C. Warhurst, *Plasmodium falciparum* in Kenya: high prevalence of drug-resistance-associated polymorphisms in hospital admissions with severe malaria in an epidemic area. *Ann Trop Med Parasitol* **95**, 661–669 (2001).
198. S. G. Staedke, *et al.*, Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine–pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. *Tropical Medicine & International Health* **9**, 624–629 (2004).
199. J. G. Kublin, *et al.*, Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **185**, 380–388 (2002).
200. F. P. Mockenhaupt, *et al.*, *Plasmodium falciparum* dhfr but not dhps mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana. *Trop Med Int Health* **10**, 901–908 (2005).
201. M. Alifrangis, *et al.*, Five-year surveillance of molecular markers of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in Korogwe District, Tanzania: accumulation of the 581G mutation in the *P. falciparum* dihydropteroate synthase gene. *Am J Trop Med Hyg* **80**, 523–527 (2009).
202. J. M. Ngondi, *et al.*, Surveillance for sulfadoxine-pyrimethamine resistant malaria parasites in the Lake and Southern Zones, Tanzania, using pooling and next-generation sequencing. *Malar J* **16**, 236 (2017).
203. A. O. Mohamed, *et al.*, Assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance molecular markers from the Blue Nile State, Southeast Sudan. *Malar J* **19**, 78 (2020).
204. WHO, Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. (2009). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241597531> [Accessed 15 July 2025].
205. WHO, Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. (2007). Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/43824> [Accessed 18 August 2025].
206. M. Desai, *et al.*, Impact of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy at clearing infections and preventing low birth weight. *Clin Infect Dis* **62**, 323–333 (2016).
207. A. Mousa, *et al.*, Impact of dhps mutations on sulfadoxine-pyrimethamine protective efficacy and implications for malaria chemoprevention. *Nat Commun* **16**, 4268 (2025).

208. F. O. ter Kuile, A. M. van Eijk, S. J. Filler, Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. *JAMA* **297**, 2603–2616 (2007).
209. F. T. Muanda, *et al.*, Antimalarial drugs for preventing malaria during pregnancy and the risk of low birth weight: a systematic review and meta-analysis of randomized and quasi-randomized trials. *BMC Med* **13**, 193 (2015).
210. R. M. Chico, *et al.*, Influence of malaria transmission intensity and the 581G mutation on the efficacy of intermittent preventive treatment in pregnancy: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* **20**, 1621–1633 (2015).
211. A. M. van Eijk, *et al.*, Effect of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **19**, 546–556 (2019).
212. A. M. van Eijk, *et al.*, The impact of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive treatment for the prevention of malaria in pregnancy in Africa: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* (2025). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(25\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00219-1).
213. WHO, Recommandation générale de l’OMS sur le traitement préventif intermittent du nourrisson à la sulfadoxine-pyriméthamine pour lutter contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* en Afrique. (2010). Available at: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/338711/WHO-HTM-GMP-2010.01-fre.pdf>.
214. WHO, WHO Evidence Review Group on Intermittent Preventive Treatment (IPT) of malaria in pregnancy. (2013). Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/malaria/mpac-documentation/mpac-sep13-erg-ipt-malaria-pregnancy-report.pdf>.
215. A. R. Wargo, S. Huijben, J. C. de Roode, J. Shepherd, A. F. Read, Competitive release and facilitation of drug-resistant parasites after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19914–19919 (2007).
216. W. E. Harrington, *et al.*, Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9027–9032 (2009).
217. J. Gutman, *et al.*, The A581G mutation in the gene encoding *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase reduces the effectiveness of sulfadoxine-pyrimethamine preventive therapy in malawian pregnant women. *J Infect Dis* **211**, 1997–2005 (2015).
218. D. Chandramohan, *et al.*, Cluster randomised trial of intermittent preventive treatment for malaria in infants in area of high, seasonal transmission in Ghana. *BMJ* **331**, 727–733 (2005).
219. D. Schellenberg, *et al.*, Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* **365**, 1481–1483 (2005).

220. M. P. Grobusch, *et al.*, Intermittent preventive treatment against malaria in infants in Gabon--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* **196**, 1595–1602 (2007).
221. D. Schellenberg, *et al.*, Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* **357**, 1471–1477 (2001).
222. R. D. Gosling, *et al.*, Protective efficacy and safety of three antimalarial regimens for intermittent preventive treatment for malaria in infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **374**, 1521–1532 (2009).
223. J. M. Sá, *et al.*, Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18883–18889 (2009).
224. L. Arnold, *et al.*, Further improvements of the *P. falciparum* humanized mouse model. *PLOS ONE* **6**, e18045 (2011).
225. T. W. A. Kooij, M. M. Rauch, K. Matuschewski, Expansion of experimental genetics approaches for *Plasmodium berghei* with versatile transfection vectors. *Molecular and Biochemical Parasitology* **185**, 19–26 (2012).
226. C. J. Janse, *et al.*, A genotype and phenotype database of genetically modified malaria-parasites. *Trends in Parasitology* **27**, 31–39 (2011).
227. E. Deligianni, I. S. Kiamos, Gene editing in *Plasmodium berghei* made easy: Development of a CRISPR/Cas9 protocol using linear donor template and ribozymes for sgRNA generation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **246**, 111415 (2021).
228. N. Shinzawa, *et al.*, Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing *Plasmodium berghei* with linear donor template. *Commun Biol* **3**, 426 (2020).
229. P. Koonyosying, *et al.*, Transgenic pyrimethamine resistant *Plasmodium berghei* as a model for in vivo anti-DHFR drug testing. [Preprint] (2020).
230. C. Pethrak, *et al.*, New insights into antimalarial chemopreventive activity of antifolates. *Antimicrob Agents Chemother* **66**, e01538-21.
231. M. Yamauchi, M. Hirai, S.-I. Tachibana, T. Mori, T. Mita, Fitness of sulfadoxine-resistant *Plasmodium berghei* harboring a single mutation in dihydropteroate synthase (DHPS). *Acta Trop* **222**, 106049 (2021).
232. W. A. Azmi, *et al.*, Antimalarial drug sulfadoxine induces gametocytogenesis in *Plasmodium berghei*. *Malar J* **23**, 267 (2024).
233. F. A. Fehintola, S. T. Balogun, S. B. Adeoye, Intermittent preventive treatment during pregnancy with sulphadoxine-pyrimethamine may promote *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Med Princ Pract* **21**, 63–67 (2012).

234. S. Jafari-Guemouri, J. Dhiab, A. Massougbojji, P. Deloron, N. N. Tuikue, Dynamics of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in pregnant women under intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Benin. *Malar J* **17**, 356 (2018).
235. C. V. Plowe, Malaria chemoprevention and drug resistance: a review of the literature and policy implications. *Malaria Journal* **21**, 104 (2022).
236. L.-M. Birkholtz, *et al.*, Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malar J* **7**, 197 (2008).
237. M. J. Gardner, *et al.*, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 10.1038/nature01097 (2002).
238. J. A. Fernández-Robledo, G. R. Vasta, Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends Parasitol* **26**, 244–254 (2010).
239. D. G. Mudeppa, P. K. Rathod, Expression of functional *Plasmodium falciparum* enzymes using a wheat germ cell-free system. *Eukaryot Cell* **12**, 1653–1663 (2013).
240. D. G. Mudeppa, *et al.*, Cell-free production of functional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **151**, 216–219 (2007).
241. L. Michaelis, M. L. Menten, K. A. Johnson, R. S. Goody, The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50**, 8264–8269 (2011).
242. E. Jaspard, *Enzymologie fondamentale*, Ellipses (2019).
243. Y. Wu, L. A. Kirkman, T. E. Wellems, Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 1130–1134 (1996).
244. J. Yuvaniyama, *et al.*, Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nat Struct Mol Biol* **10**, 357–365 (2003).
245. Y. Talawanich, S. Kamchonwongpaisan, W. Sirawaraporn, Y. Yuthavong, Use of bacterial surrogates as a tool to explore antimalarial drug interaction: Synergism between inhibitors of malarial dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase. *Acta Tropica* **149**, 64–69 (2015).
246. N. Suwanakitti, *et al.*, *folA thyA* knockout *E. coli* as a suitable surrogate model for evaluation of antifolate sensitivity against *PfDHFR-TS*. *Acta Tropica* **258**, 107360 (2024).
247. S. J. Bates, *et al.*, Rare, highly pyrimethamine-resistant alleles of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase gene from 5 African sites. *The Journal of Infectious Diseases* **190**, 1783–1792 (2004).

248. P. Wang, P. F. Sims, J. E. Hyde, A modified in vitro sulfadoxine susceptibility assay for *Plasmodium falciparum* suitable for investigating Fansidar resistance. *Parasitology* **115** ( Pt 3), 223–230 (1997).
249. W. K. Milhous, N. F. Weatherly, J. H. Bowdre, R. E. Desjardins, In vitro activities of and mechanisms of resistance to antifol antimalarial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 525–530 (1985).
250. W. M. Watkins, R. E. Howells, A. D. Brandling-Bennett, D. K. Koech, In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Jilore, Kenya, to antimalarial drugs. *Am J Trop Med Hyg* **37**, 445–451 (1987).
251. A. Schapira, I. C. Bygbjerg, S. Jepsen, H. Flachs, M. W. Bentzon, The susceptibility of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine and pyrimethamine: correlation of in vivo and in vitro results. *Am J Trop Med Hyg* **35**, 239–245 (1986).
252. J. Berglez, P. Iliades, W. Sirawaraporn, P. Coloe, I. Macreadie, Analysis in *Escherichia coli* of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (DHPS) alleles implicated in resistance to sulfadoxine. *Int J Parasitol* **34**, 95–100 (2004).
253. V. Lumb, Y. D. Sharma, Novel K540N mutation in *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase confers a lower level of sulfa drug resistance than does a K540E mutation. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2481–2482 (2011).
254. P. Chitnumsub, *et al.*, The structure of *Plasmodium falciparum* hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase reveals the basis of sulfa resistance. *FEBS J* **287**, 3273–3297 (2020).
255. H. Abdizadeh, *et al.*, Increased substrate affinity in the *Escherichia coli* L28R dihydrofolate reductase mutant causes trimethoprim resistance. *Phys Chem Chem Phys* **19**, 11416–11428 (2017).
256. J. Agniswamy, *et al.*, Highly drug-resistant HIV-1 protease mutant PRS17 shows enhanced binding to substrate analogues. *ACS Omega* **4**, 8707–8719 (2019).
257. J. C. Kendrew, *et al.*, A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* **181**, 662–666 (1958).
258. X.-D. Su, *et al.*, Protein crystallography from the perspective of technology developments. *Crystallogr Rev* **21**, 122–153 (2015).
259. R. F. Service, ‘The game has changed.’ AI triumphs at protein folding. *Science* **370**, 1144–1145 (2020).
260. J. Jumper, *et al.*, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
261. S. Aguéro-Pizzolo, E. Bettler, P. Gouet, Prix Nobel de chimie 2024: David Baker, Demis Hassabis et John M. Jumper - La révolution de l’intelligence artificielle en biologie structurale. *Med Sci (Paris)* **41**, 367–373 (2025).

262. R. O. Dror, R. M. Dirks, J. P. Grossman, H. Xu, D. E. Shaw, Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annual review of biophysics* **41**, 429–452 (2012).
263. S. A. Adcock, J. A. McCammon, Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem. Rev.* **106**, 1589–1615 (2006).
264. D. E. Shaw, *et al.*, Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton in *Proceedings of the Conference on High Performance Computing Networking, Storage and Analysis*, SC '09., (Association for Computing Machinery, 2009), pp. 1–11.
265. A. Warshel, M. Levitt, Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J Mol Biol* **103**, 227–249 (1976).
266. H. M. Senn, W. Thiel, QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 1198–1229 (2009).
267. D. A. Case, *et al.*, The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668–1688 (2005).
268. J. A. Maier, *et al.*, ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
269. T. Lemcke, I. T. Christensen, F. S. Jørgensen, Towards an understanding of drug resistance in malaria: Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase by homology building. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 1003–1011 (1999).
270. G. Rastelli, *et al.*, Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: structural basis of antifolate resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8**, 1117–1128 (2000).
271. O. A. Santos-Filho, R. B. de Alencastro, J. D. Figueroa-Villar, Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. *Biophysical Chemistry* **91**, 305–317 (2001).
272. R. T. Delfino, O. A. Santos-Filho, J. D. Figueroa-Villar, Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant *Plasmodium falciparum* DHFR. *Biophys Chem* **98**, 287–300 (2002).
273. Y. Yuthavong, *et al.*, Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 16823–16828 (2012).
274. T. A. P. de Beer, A. I. Louw, F. Joubert, Elucidation of sulfadoxine resistance with structural models of the bifunctional *Plasmodium falciparum* dihydropteridine pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase. *Bioorg Med Chem* **14**, 4433–4443 (2006).

275. A. Achari, *et al.*, Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* **4**, 490–497 (1997).
276. I. C. Hampele, *et al.*, Structure and function of the dihydropteroate synthase from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* **268**, 21–30 (1997).
277. M. Yogavel, *et al.*, Structure of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase from *Plasmodium vivax* sheds light on drug resistance. *J Biol Chem* **293**, 14962–14972 (2018).
278. M. Korsinczky, *et al.*, Sulfadoxine resistance in *Plasmodium vivax* is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2214–2222 (2004).
279. L.-M. Birkholtz, *et al.*, Parasite-specific inserts in the bifunctional S-adenosylmethionine decarboxylase/ornithine decarboxylase of *Plasmodium falciparum* modulate catalytic activities and domain interactions. *Biochem J* **377**, 439–448 (2004).
280. I. Wheeldon, *et al.*, Substrate channelling as an approach to cascade reactions. *Nat Chem* **8**, 299–309 (2016).
281. M.-K. Yun, *et al.*, Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science* **335**, 1110–1114 (2012).
282. W. Kasekarn, R. Sirawaraporn, T. Chahomchuen, A. F. Cowman, W. Sirawaraporn, Molecular characterization of bifunctional hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **137**, 43–53 (2004).
283. R. A. Boateng, *et al.*, Global analysis of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase variants associated with sulfadoxine resistance reveals variant distribution and mechanisms of resistance: A computational-based study. *Molecules* **28**, 145 (2022).
284. M. V. Bertacine Dias, J. C. Santos, G. A. Libreros-Zúñiga, J. A. Ribeiro, S. M. Chavez-Pacheco, Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. *Future Med Chem* **10**, 935–959 (2018).
285. C. Roizard, Substitution et élimination en chimie organique. Available at: <https://cahier-de-prepa.fr/pcsi-perrin/download?id=3323> [Accessed 24 June 2025].
286. A. M. Baca, R. Sirawaraporn, S. Turley, W. Sirawaraporn, W. G. Hol, Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J Mol Biol* **302**, 1193–1212 (2000).
287. K. Babaoglu, J. Qi, R. E. Lee, S. W. White, Crystal structure of 7,8-dihydropteroate synthase from *Bacillus anthracis*: mechanism and novel inhibitor design. *Structure* **12**, 1705–1717 (2004).
288. W. Chotpatiwetchkul, K. Boonyarattanakalin, D. Gleeson, M. P. Gleeson, Exploring the catalytic mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and inhibitor. *Org Biomol Chem* **15**, 5593–5601 (2017).

289. WWARN, SP Molecular Surveyor. Available at: <http://www.wwarn.org/dhfr-dhps-surveyor/#0> [Accessed 9 April 2025].
290. H. F. Mbacham, *et al.*, Sub-microscopic *Plasmodium falciparum* parasitaemia, dihydropteroate synthase (dhps) resistance mutations to sulfadoxine-pyrimethamine, transmission intensity and risk of malaria infection in pregnancy in Mount Cameroon Region. *Malar J* **22**, 73 (2023).
291. P. V. K. Tchienkam, *et al.*, *Plasmodium falciparum* dhps and dhfr markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine five years (2016-2020) after the implementation of seasonal malaria chemoprevention in Cameroon. *Wellcome Open Res* **9**, 323 (2024).
292. MalariaGEN, *et al.*, An open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 7,000 worldwide samples. *Wellcome Open Res* **6**, 42 (2021).
293. D. Tautz, Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* **17**, 6463–6471 (1989).
294. V. B. Mathema, S. Nakeesathit, N. J. White, A. M. Dondorp, M. Imwong, Genome-wide microsatellite characteristics of five human *Plasmodium* species, focusing on *Plasmodium malariae* and *P. ovale curtisi*. *Parasite* **27**, 34 (2020).
295. E. S. Lander, *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
296. S. O. Oyola, *et al.*, Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. *Malaria Journal* **15**, 597 (2016).
297. E. F. Hocke, *et al.*, A novel intron variant is associated with emerging *pf dhps* mutant haplotypes in West and Central African *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **29**, 100611 (2025).
298. J.-Y. Chun, *et al.*, Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res* **35**, e40 (2007).
299. S. Vinayak, *et al.*, Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*. *PLOS Pathogens* **6**, e1000830 (2010).
300. A. M. McCollum, K. Mueller, L. Villegas, V. Udhayakumar, A. A. Escalante, Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2085–2091 (2007).
301. C. Fermér, G. Swedberg, Adaptation to sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 831–837 (1997).

302. V. Sok, *et al.*, Determination of sulfadoxine and pyrimethamine in microvolume human plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandam mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **1234**, 124030 (2024).
303. A. Y. Olukosi, *et al.*, Baseline prevalence of molecular marker of sulfadoxine/pyrimethamine resistance in Ebonyi and Osun states, Nigeria: amplicon deep sequencing of dhps-540. *J Antimicrob Chemother* **78**, 788–791 (2023).
304. S. Apaydin, M. Török, Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **29**, 2042–2050 (2019).
305. D. P. Mishra, *et al.*, Repurposing sulfonamide-scaffolds for enhanced and sustainable malaria therapy. *Future Med Chem* **17**, 1315–1335 (2025).
306. A. Trejo, Y. Avalos-Padilla, C. Alonso, X. Fernàndez-Busquets, C. Masdeu, Sulfadoxine derivatization through multicomponent reactions to obtain new antiplasmodial compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **129**, 118313 (2025).
307. F. Gentile, *et al.*, Artificial intelligence-enabled virtual screening of ultra-large chemical libraries with deep docking. *Nat Protoc* **17**, 672–697 (2022).
308. “FleXible (FlexMod) version 1.6 (2021) n° APP : IDDN.FR.001.530001.000.10000.”
309. M. Brut, A. Estève, G. Landa, M. Djafari Rouhani, Toward in silico biomolecular manipulation through static modes: atomic scale characterization of HIV-1 protease flexibility. *J Phys Chem B* **118**, 2821–2830 (2014).

## Liste des publications

### Articles publiés

**Guemas E**, Coppée R, Ménard S, Manoir M du, Nsango S, Mvumbi DM, *et al.* Evolution and spread of *Plasmodium falciparum* mutations associated with resistance to sulfadoxine–pyrimethamine in central Africa: a cross-sectional study. *The Lancet Microbe*. 2023;4(12):e983–93.

Cohen O\*, **Guemas E**\*, Menard S, Tsague Kenfack M, Talom Ngassa C, Iriart X, *et al.* Effect of sulfadoxine-pyrimethamine chemoprophylaxis in pregnant women on selection of the new *P. falciparum* dhps quintuple mutant carrying the I431V mutation. *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(3):665–8.

\* Contributions égales en tant que premiers auteurs

**Guemas E**, Ménard S, Jeanne N, Landa G, Berry A and Brut M. Deciphering the Impact of Mutations in *Pf*DHPS Active Site and Sulfadoxine Binding: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Molecules*. 2025;30(20):4118.

### Article en préparation

**Guemas E**, Ménard S, Berry A and Brut M. Unravelling the *Pf*DHPS catalytic mechanism through molecular dynamics simulations

## Liste des communications

### Communications orales

**Guemas E**, Ménard S, Berry A, Brut M. Etude à l'échelle atomique du nouveau quintuple mutant de la dihydroptéroate synthase de *Plasmodium falciparum*. Société Française de Parasitologie (SFP), Angers, 2024

**Guemas E**, Ménard S, Berry A, Brut M. Etude à l'échelle atomique de la dihydroptéroate synthase de *Plasmodium falciparum* et de la mutation I431V. Consortium Antiparasitaire et Antifongique (CaPF), Toulouse, 2024

**Guemas E**, Ménard S, Berry A, Brut M. Study of the I431V mutation in *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase. Journées de l'école doctorale (JED), Toulouse, 2023

**Guemas E**, Coppée R, Ménard S, Nsango S, Mvumbi DM, Eboumbou C, Bouyou Akotet MK, Lekana-Douki JB, Ariey F, Berry A. Evolution and spread of *Plasmodium falciparum dhps* quintuple mutant carrying the I431V mutation in Central Africa: a cross-sectional study. European Congress on Tropical Medicine and International Health (ECTMIH), Utrecht, Pays-Bas, 2023

### Communications affichées

**Guemas E**, Menard S, Berry A. *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine – The hidden part of the iceberg. European Congress on Tropical Medicine and International Health (ECTMIH), Hamburg, Allemagne, 2025

**Guemas E**, Menard S, Berry A, Brut M. Study of the I431V mutation in *Plasmodium falciparum* DHPS. Group of Graphism and Molecular Modelling (GGMM), Toulouse, 2023

**Guemas E**, Menard S, Berry A, Brut M. Etude de la mutation I431V de DHPS de *Plasmodium falciparum*. Les Toulousaines du Calcul Atomique et Moléculaire (TOUCAM), Toulouse, 2022

**Titre :** Etude des mutants de la dihydroptéroate synthase de *Plasmodium falciparum* porteurs de la mutation Ile431Val : du terrain à l'atome

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine, PfDHPS, résistance, modélisation, dynamique moléculaire

**Résumé :** Les parasites du genre *Plasmodium*, protozoaires intraérythrocytaires à transmission vectorielle, sont les agents responsables du paludisme. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes paient le plus lourd tribut de cette parasitose et l'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de la grande majorité de la mortalité ( $\approx 600\,000$  décès par an). La sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est la bithérapie à la base de la chimioprophylaxie du paludisme chez la femme enceinte et chez les enfants de moins de 5 ans. La SP bloque la synthèse des folates en inhibant 2 enzymes parasitaires, la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), respectivement. Ces stratégies de chimioprévention par la SP sont des outils efficaces pour lutter contre la morbi-mortalité imputable au paludisme, mais les résistances menacent leur efficacité. La relation entre les mutations des gènes codant pour la DHPS et la DHFR, et l'efficacité de l'association SP est complexe.

Une nouvelle mutation de la PfDHPS, Ile431Val, identifiée pour la première fois au Nigéria il y a quelques années, et fréquemment retrouvée avec 4 autres mutations formant le quintuple mutant vagKgs est peu étudiée. Ce travail de thèse avait pour objectif de décrire l'épidémiologie de cette mutation et des allèles associés, et d'évaluer leurs impacts sur la résistance à la sulfadoxine. Dans ce travail, les études de terrain ont permis de montrer que cette mutation Ile431Val, était d'origine africaine, exclusivement présente en Afrique de l'Ouest et Centrale, avec une fréquence supérieure à 50% dans certains sites. La mise en évidence de l'émergence récente et clonale du quintuple mutant vagKgs, corroborée au fait qu'il soit sur-représenté chez les femmes enceintes ayant reçu un traitement par SP, suggèrent un certain niveau de résistance à la sulfadoxine. La modélisation par dynamique moléculaire de la structure atomique de la PfDHPS, qui, jusqu'alors, était peu étudiée, et donc mal comprise, a révélé d'une part, le rôle déterminant de la boucle D2 dans les interactions avec le ligand naturel et la sulfadoxine, et d'autre part, la réorganisation substantielle du site actif du quintuple mutant vagKgs. L'obtention de ces structures a permis de débiter l'étude du mécanisme réactionnel de l'enzyme.

La poursuite des études de terrain, des évaluations biologiques *in vivo* et *in vitro*, et de la modélisation à l'échelle atomique sont nécessaires pour préciser le phénotype de résistance à la sulfadoxine de ces allèles de la PfDHPS, et déterminer dans quelle mesure l'efficacité des chimioprophylaxies par SP est menacée.

**Title:** Study of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase mutants carrying the Ile431Val mutation: from the field to the atom

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, sulfadoxine, PfDHPS, resistance, modeling, molecular dynamics

**Abstract:** *Plasmodium* parasites, vector-borne intraerythrocytic protozoa, are the causative agents of malaria. Children under 5 years of age and pregnant women bear the brunt of this parasitic disease, and *Plasmodium falciparum* is responsible for the vast majority of deaths ( $\approx 600,000$  deaths per year). Sulfadoxine-pyrimethamine (SP) is the dual therapy used for malaria chemoprophylaxis in pregnant women and children under 5 years of age. SP blocks folate synthesis by inhibiting two parasitic enzymes, dihydrofolate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), respectively. These SP chemoprevention strategies are effective tools for combating malaria-related morbidity and mortality, but resistance threatens their effectiveness. The relationship between mutations in the genes encoding DHPS and DHFR and the efficacy of the SP combination is complex.

A new PfDHPS mutation, Ile431Val, first identified in Nigeria a few years ago and frequently found associated with four other mutations forming the quintuple mutant vagKgs, has been little studied. The aim of this thesis was to describe the epidemiology of this mutation and associated alleles, and to assess their impact on sulfadoxine resistance. In this study, field studies showed that the Ile431Val mutation has an African origin, found exclusively in West and Central Africa, with a frequency of over 50% in some sites. The evidence of the recent and clonal emergence of the quintuple mutant vagKgs, corroborated by the fact that it is over-represented in pregnant women who have received SP treatment, suggests a certain level of resistance to sulfadoxine. Molecular dynamics modeling of the atomic structure of PfDHPS, which until then had been little studied and therefore poorly understood, revealed, on the one hand, the decisive role of the D2 loop in interactions with the natural ligand and sulfadoxine and, on the other hand, the substantial reorganization of the active site of the quintuple mutant vagKgs. Obtaining these structures has enabled the study of the enzyme's reaction mechanism to begin.

Further field studies, *in vivo* and *in vitro* biological assessments, and atomic-scale modeling are needed to clarify the sulfadoxine resistance phenotype of these PfDHPS alleles and determine the extent to which the efficacy of SP chemoprophylaxis is threatened.