

METHODES D'ETUDE DE LA CHIMIORESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX QUINOLEINES

S. PICOT

• Service de Parasitologie-Mycologie et des Maladies Tropicales, EA 3087, Laboratoire d'Etude Moléculaire des Agents Transmissibles (LEMAT) (S.P., Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Chef de Service, Directeur du LEMAT), Université Claude Bernard Lyon 1, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon, France • Fax : +33 (0) 4 78 75 17 72 e-mail : picot@rockefeller.univ-lyon1.fr •

Med. Trop. 2001 ; **61** : 15-20

La résistance de *Plasmodium falciparum* aux médicaments est un phénomène variable en fonction des zones d'endémie et variable dans le temps. Le recueil d'informations fiables et comparables d'une zone géographique à l'autre est une étape importante vers une utilisation optimale des antipaludiques disponibles. Trop souvent, les choix thérapeutiques sont effectués sur des données intuitives ou basés sur des études dont la méthodologie n'est pas toujours strictement adaptée aux conditions épidémiologiques locales. La conséquence en est parfois l'utilisation systématique de médicaments dont l'usage devrait être réservé aux zones de résistance avérée. Mieux définir les chimiorésistances, mettre en œuvre systématiquement des protocoles standardisés d'évaluation de ces résistances et analyser les résultats obtenus en tenant compte du niveau de transmission, sont des éléments essentiels pour le choix des traitements de première et de seconde intention, spécifiques des conditions épidémiologiques locales.

La littérature scientifique et médicale est riche en informations concernant l'état de la résistance aux antipaludiques dans le monde. Dans la mesure où beaucoup de ces informations ont été recueillies à l'aide de méthodologies et dans des conditions expérimentales disparates, il semble vain de vouloir en faire une synthèse dans le temps et dans l'espace. Le lecteur se reportera avantagèrement aux données spécifiques par zones qui sont accessibles par l'intermédiaire de nombreux sites Internet spécialisés. En revanche, l'importance des méthodes d'évaluation de la résistance et leur évolution récente justifient qu'un état des lieux soit proposé.

Les méthodes d'évaluation de la résistance reposent sur trois types de tests. Les tests *in vivo* témoignent directement de l'efficacité thérapeutique chez les malades. Les tests *in vitro* consistent en la culture d'iso-

lats de *Plasmodium* en présence de concentrations croissantes de médicaments. Ils permettent de mesurer l'effet direct d'une drogue sur les parasites. Enfin, la recherche de marqueurs moléculaires est un domaine en cours d'étude par de nombreuses équipes. Dans ce cas, l'objectif est plutôt de prédire la possibilité d'une résistance associée à un mécanisme précis, mais pas de vérifier l'efficacité d'un médicament dans une population. Les résultats obtenus par ces trois types de méthodes ne sont pas superposables et les extrapolations ne sont pas possibles. Chacune de ces méthodes a une place précise dans l'arsenal clinico-biologique d'étude de la chimio-résistance.

Méthodes de mesure de la chimio-résistance

L'OMS a depuis longtemps mis en place et standardisé des tests *in vivo* et *in vitro* efficaces pour évaluer le niveau de chimiorésistance dans une zone de transmission (1). Ces tests présentent des caractéristiques et des objectifs différents. Seuls les tests *in vivo* permettent d'évaluer l'efficacité réelle d'un régime thérapeutique chez un patient sans que les raisons de cette efficacité ou des échecs ne soient vraiment connues. En revanche, les tests *in vitro* permettent une approche plus analytique sur le plan biologique de la sensibilité ou non d'un isolat de parasite vis-à-vis d'un médicament, mais ils ne permettent pas de préjuger de l'efficacité éventuelle de l'utilisation de ce médicament dans une population.

Tests *in vivo*.

Les tests *in vivo* présentent l'avantage d'évaluer la chimio-résistance dans le contexte global de la maladie et ils tiennent compte de la réponse immunologique de l'hôte qui est fortement liée à l'intensité de

la transmission. Ces tests ont été améliorés au cours de ces dernières années de façon à être adaptés à l'intensité de la transmission (zone d'endémicité modérée à faible et zone de forte endémicité) et à l'âge des patients. Cependant, ces tests demandent un suivi clinique et biologique des patients à de nombreuses reprises (4 à 6 consultations après le début du traitement) et ne peuvent être mis en œuvre que si l'accès aux soins est facile pour les malades (2).

Le principe général des tests *in vivo* est de suivre l'évolution clinique et biologique d'un patient chez lequel un paludisme a été diagnostiqué et pour lequel un traitement a été instauré. Cela implique d'une part que le malade puisse être surveillé pendant plusieurs jours et à de nombreuses reprises et que le traitement ne soit pas modifié au cours du suivi. Ces principes imposent donc le respect d'un certain nombre de règles éthiques, en excluant les patients présentant un paludisme sévère ou une aggravation des symptômes au cours du suivi.

Les premiers systèmes de tests standardisés pour l'évaluation de la résistance de *Plasmodium falciparum in vivo* ont été développés à la fin des années 60 pour la chloroquine. Ils ont été rapidement améliorés et adaptés aux autres antipaludiques schizonticides. Le principal problème posé par ces tests était la nécessité d'un examen de sang quotidien pour des périodes de 7 à 28 jours. De plus, ces tests ne tenaient compte que de la réponse parasitologique chez des personnes non immunes et ne prenaient que très peu en considération la réponse clinique aux médicaments et le niveau d'endémicité.

Pourtant, la chloroquino-résistance existe dans des zones où la transmission est faible ou modérée, en particulier certaines zones d'Asie du Sud-Est, d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud. Cela concerne également certaines régions d'Afrique inter-tropicale, en particulier

celles où les variations saisonnières sont importantes. Un protocole adapté à ces situations a été présenté en octobre 1996 à Manille et adopté à Phnom Penh en octobre 2000. Lors de ces réunions, il a été mis en évidence la nécessité d'une classification unique, utilisable aussi bien pour les zones de transmission intense que pour les zones de transmission modérée (2).

Les nouveaux protocoles, prenant en compte la réponse parasitologique et la réponse clinique, sont comparables entre différentes régions et ne nécessitent pas de matériel ou de compétences inaccessibles sur le terrain. L'objectif de ces tests *in vivo* est de déterminer l'efficacité d'un schéma thérapeutique dans une zone donnée afin de démontrer soit son efficacité, soit la nécessité de le modifier. Cela implique que ce protocole ne soit appliqué qu'avec des médicaments anti-paludiques qui sont accessibles au système de santé local.

• Principe du test

Pour un patient donné, le protocole consiste à enregistrer la présentation clinique, la température axillaire, la parasitémie et le poids du corps à J0 (avant le traitement). Après mise en œuvre d'un traitement adapté et réputé efficace, les signes cliniques, la température axillaire et la parasitémie sont enregistrés aux jours 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28. Les tests de 28 jours sont recommandés pour les zones de transmission faible à modérée et pour les antipaludiques à longue demi-vie. Les tests de 14 jours sont plus appropriés pour les zones de transmission intense en raison de la fréquence des ré-infections. Seuls les malades ne présentant pas de signes de gravité et pour lesquels un consentement informé a été obtenu peuvent être inclus dans ces tests.

Toutes les doses thérapeutiques doivent être données sous surveillance et le patient doit être observé pendant 30 minutes, après l'administration, pour vérifier l'absence de vomissements. Dans le cas contraire, le traitement doit être répété à la même dose. Dans la mesure où ces tests sont prévus pour des accès non sévères et non compliqués, seuls les traitements par voie orale doivent être utilisés. Les enfants présentant des vomissements répétés doivent être exclus de l'étude et recevoir rapidement une première dose de quinine par voie parentérale.

Lors de la mise en place de protocoles de surveillance de la résistance, la qualité et l'origine des médicaments disponibles dans les centres de santé doivent être contrôlés. Les contre-façons sont très répandues en zone inter-tropicale et sont impliquées dans un nombre important

d'échecs thérapeutiques en l'absence de résistance du parasite. Certaines ONG ont développé des systèmes de mini-laboratoires portables comportant le matériel et les réactifs permettant de vérifier facilement la composition d'une liste de plus en plus longue de médicaments. D'un coût encore élevé, ces valises auront probablement une place importante dans une meilleure connaissance des causes de la chimio-résistance. Leur développement est à encourager et leur diffusion devrait être plus large.

• Modalité de sélection des patients

Les tests de chimiosensibilité *in vivo* ne sont pas destinés à un diagnostic individuel mais à des études épidémiologiques contrôlées et longuement réfléchies. Ces études doivent être menées dans des laboratoires de référence ou des sites sentinelles émanant de ces laboratoires. Les médicaments utilisés pour le traitement des patients inclus dans le test doivent être ceux prescrits normalement en première intention dans la zone. Les patients dont l'évolution clinique ou parasitologique n'est pas favorable doivent être traités sans délai selon le schéma de seconde intention et être exclus de l'étude.

Critères d'inclusion

- Age supérieur à 6 mois,
- Mono-infection à *Plasmodium falciparum*, de 1 000 à 30 000 parasites/ μ l,
- Fièvre,
- Température axillaire inférieure à 39,5° C,
- Capacité à venir aux visites de suivi et accès facile à des structures de soins,
- Consentement éclairé du patient ou de ses représentants.

Critères d'exclusion

- Présence d'un signe de gravité ou d'un paludisme compliqué,
- Présence d'une maladie grave,
- Présence d'une malnutrition sévère,
- Grossesse,
- Maladie fébrile autre que le paludisme.

La prise préalable d'antipaludiques n'est pas un critère d'exclusion, mais doit être notée et prise en compte dans l'interprétation des résultats. Les dosages urinaires complètent le recueil des informations concernant la circulation des antipaludiques dans la population, mais ne sont pas indispensables à la réalisation des tests *in vivo*. A la fin du test, les données obtenues doivent être saisies à l'aide d'un logiciel d'analyses épidémiologiques, par exemple le logiciel Epi-Info®.

• Interprétation du test *in vivo*

La réponse thérapeutique est classée en trois catégories :

Réponse clinique et parasitologique adéquate (*adequate clinical and parasitological response* : ACPR)

Echec thérapeutique tardif (*Late Treatment Failure* : LTF)

- Aggravation ou paludisme sévère après J3 avec une parasitémie
- Parasitémie avec température > 37,5°C au moins une fois entre J4 et J28

Echec thérapeutique précoce (*Early Treatment Failure* : ETF)

- Aggravation ou paludisme sévère à J1, J2 ou J3 avec une parasitémie
- Parasitémie à J3 avec température > 37,5°C
- Parasitémie à J2 > parasitémie à J0
- Parasitémie à J3 > 25% de parasitémie à J0

Tests *in vitro*.

Le test *in vitro* permet de déterminer le niveau d'efficacité d'un médicament sur *Plasmodium falciparum* sans tenir compte de la prémunition du patient. Ce test indique le seuil de sensibilité des isolats provenant de patients et est utilisé pour suivre l'évolution de cette sensibilité dans le temps. Une baisse de sensibilité *in vitro* peut être un élément prédictif d'échec thérapeutique dans la population. A la différence des tests *in vivo*, le test *in vitro* est indépendant du niveau de transmission et de l'état clinique des patients et il permet de tester plusieurs médicaments en même temps. Cependant, ce test ne permet pas d'orienter le schéma thérapeutique chez un patient donné car il ne prend pas en compte les données pharmacologiques et immunologiques. C'est seulement la confrontation entre les résultats des tests *in vivo* et *in vitro* qui permet de faire la différence entre une résistance et un échec thérapeutique dû à des facteurs pharmacodynamiques.

La méthode à utiliser pour évaluer la sensibilité de *Plasmodium falciparum* *in vitro* est le test MARK III de l'OMS, décrit en 2000. Ce test est adapté à l'évaluation des principaux antipaludiques : chloroquine, méfloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyriméthamine et artémisinine. Il est également disponible pour tester l'halofantrine, la pyronaridine et la pyriméthamine.

Compte-tenu des spécificités de ce test, les échantillons doivent provenir de patients n'ayant pas bénéficié d'un traitement antipaludique antérieur. Selon la demi-vie des produits, seront exclus les patients ayant reçu soit un traitement par quinine, artémisinine ou ses dérivés depuis moins de 7 jours, soit un traitement par 4-amino-quinoléine depuis moins de 14

jours, soit un traitement par pyriméthamine ou sulfonamide depuis moins de 28 jours, soit un traitement par méfloquine depuis moins de 56 jours. Les dosages urinaires des antipaludiques ne sont pas assez sensibles pour détecter la présence de médicaments avec de tels délais. Ces contraintes restreignent évidemment l'usage de ce test dans les zones où l'automédication non contrôlée est fréquente. La parasitémie doit être mesurée et seuls les patients présentant une mono-infection par *Plasmodium falciparum* (1 000 à 80 000 parasites/ μ l) sont inclus.

Comme pour le test *in vivo*, l'aspect éthique est prioritaire et un traitement adapté doit être débuté immédiatement après que le prélèvement de sang pour le test ait été effectué. Dans tous les cas, ce prélèvement ne doit pas retarder la mise en route d'un traitement.

Le test consiste en l'incubation de l'échantillon en présence de différentes concentrations du médicament sur une microplaque de 96 puits, à 37°C dans une cloche à bougie. Les résultats sont mesurés par la réalisation d'un frottis sanguin à partir de la culture après 24 à 30 heures d'incubation et l'évaluation de la maturation des parasites en schizontes à 3 ou 8 noyaux selon les drogues. Le degré d'inhibition de la maturation en schizontes permet de déterminer le niveau de sensibilité de l'isolat. Dans les conditions optimales de réalisation du test, tant sur le plan biologique et pharmacologique qu'épidémiologique, il est admis que les résultats donnent une bonne indication du risque d'échec thérapeutique dans une population. Mais ces conditions idéales sont difficiles à obtenir en zone d'hyperendémie.

Bases génomiques de la résistance

Les données concernant les mécanismes génomiques de la résistance aux antipaludiques sont bien connues et largement commentées dans la littérature. En revanche, les bases moléculaires de la résistance aux quinoléines font l'objet de discussions beaucoup plus contradictoires. Des résultats intéressants ont été publiés ces dernières années et c'est uniquement cet aspect de la résistance qui sera abordé ici.

Dans un premier temps seront décrits les principaux gènes et les modifications qui sont réputées être associées à la résistance. La seconde partie va décrire l'utilisation des données génomiques sur le terrain dans le but de prédire le phénotype de résistance dans diverses circonstances.

Pfmdr1 (*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance).

De nombreux points communs entre la résistance multiple des *Plasmodium* et des cellules cancéreuses ont été décrits. À partir de ces concordances apparentes, la résistance à la chloroquine a longtemps été expliquée uniquement par l'efflux du médicament à l'extérieur de la vacuole digestive sous l'action d'une pompe de type MDR (3).

Cette pompe est une protéine, proche de la glycoprotéine P (Pgp) décrite en 1986 dans les cellules cancéreuses, constituée de deux feuillettes et d'un poids moléculaire de 17 kD (4). Chacun de ces feuillettes possède des domaines trans-membranaires d'acides aminés hydrophobes. L'ensemble réalise un « canal » à travers la membrane de la vacuole digestive du parasite. Cette protéine partage avec de nombreuses autres une séquence consensus de liaison de l'ATP, appelée ABC, *ATP Binding Cassette* (5).

L'action de la Pgp n'est pas spécifique de médicaments particuliers. Cependant, elle reconnaît préférentiellement certains substrats. En effet, une mutation ponctuelle de l'AA 185 (GLY/VAL) n'augmente la résistance que vis-à-vis de certains composés. D'autres mutations ponctuelles ont été associées avec des modifications du profil de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis d'autres médicaments. Donc, la Pgp n'est pas uniquement une pompe chargée de faire sortir les xénobiotiques de la cellule. La Pgp fonctionne grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP et une modification dans la séquence des sites de liaison des nucléotides bloque la fonction de cette protéine (6). Chez *Plasmodium falciparum*, l'analogue de la Pgp a été nommée Pgh1.

À l'époque de la mise en évidence du gène *Pfmdr1* et de la Pgh1, il a semblé évident à de nombreux auteurs qu'il s'agissait là des principaux acteurs des mécanismes de résistance à la chloroquine. Plusieurs études ont été entreprises afin de démontrer cette relation. Selon les méthodologies employées et les zones géographiques, les résultats ont été différents ou contradictoires. Après plusieurs années, il n'a pas été possible de démontrer définitivement que le gène *Pfmdr1* et la Pgh1 étaient les éléments déterminants de cette résistance.

Il semble exister une relation inverse entre la résistance à la chloroquine et la résistance à la méfloquine en fonction du niveau d'activité de la Pgh1 (7). La surexpression de la Pgh1 serait impliquée dans la résistance à la méfloquine, l'halofantrine et la quinine. En revanche, la Pgh1 semble participer aux mécanismes de concentration de la chloroquine dans la vacuole digestive du parasite, soit directement, soit par régulation

du pH. Pourtant, le lien entre les mutations de la Pgh1 et le phénotype de résistance semble dépendant de l'origine géographique de la souche.

Parallèlement, des expériences de croisement génétique ont démontré une ségrégation claire entre le phénotype de résistance et un fragment de 36 Kb situé sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum* (8). Le gène *Pfmdr1* étant situé sur le chromosome 5, ces résultats ont confirmé le caractère multigénique de la résistance.

Un homologue du gène *Pfmdr1* a été mis en évidence chez *Plasmodium berghei* (9). Ce gène est amplifié chez les souches de *Plasmodium berghei* résistantes à la méfloquine. Il est intéressant de noter que ce gène est présent sur le chromosome 12 de toutes les souches testées de *Plasmodium berghei* et également présent sur le chromosome 5 des souches résistantes. Cette deuxième localisation peut correspondre à un deuxième locus, à un réarrangement chromosomique ou à une forte homologie avec un autre gène. Quoiqu'il en soit, ce résultat met en évidence le fait que la seule localisation chromosomique d'un gène n'est pas un élément suffisant pour affirmer ou réfuter le rôle de ce gène dans un phénomène.

Cg2 (candidat gene 2).

Au cours du séquençage du fragment de chromosome 7 lié à la résistance à la chloroquine, des cadres de lecture supérieurs à 100 codons ont été recherchés. Cette analyse a permis de mettre en évidence les gènes *cg1* et *cg2*; *cg2* code pour une protéine transmembranaire de 330 kDa localisée à la fois sur la vacuole digestive et la membrane du parasite.

L'étude de nombreuses souches de *Plasmodium falciparum* a montré qu'il existe des profils composés de l'association de 12 mutations ponctuelles avec un polymorphisme de 3 régions répétées (omega, kappa, gamma). Certains clones résistants présentent 14 répétitions de la région Kappa et 16 répétitions de la région oméga. Le polymorphisme de longueur de la région omega semble le plus lié à la résistance à la chloroquine (10). Cependant, même si le lien entre ces polymorphismes et la résistance à la chloroquine existe, il n'est pas absolu (11), comme l'ont démontré des expériences de transfection de ce gène chez des souches sensibles (12).

Pfcr1 (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter).

À la suite de la découverte des gènes *cg2*, David Fidock de l'équipe de Thomas Wellems, a utilisé des cadres de lecture infé-

rieurs à 100 codons sur le chromosome 7 (13) et mis en évidence le gène *Pfprt*. Ce gène présente la particularité d'être morcelé en 13 exons de 45 à 269 pb sur le chromosome 7, pour un total de 3,1 Kb.

Ce gène code pour une protéine de 48,6 kD, composée de 424 acides aminés, réalisant probablement un canal ou un transporteur à travers la membrane de la vacuole digestive. L'analyse des bases de données a montré que cette protéine appartient probablement à une nouvelle famille de transporteurs comprenant 10 fragments transmembranaires sans séquence de fixation des nucléotides. L'action de la protéine CRT pourrait être un blocage de l'accumulation de la chloroquine ou une modification du pH de la vacuole digestive, comme cela a été proposé pour la Pgh1.

Les gènes *Pfprt* des souches résistantes, quelle que soit leur origine, portent 6 à 8 mutations ponctuelles responsables de changement d'acides aminés. Ces mutations sont localisées dans le même zone du gène. Les mutations K76T et A220S semblent être essentielles à la résistance. La mutation *Pfprt* K76T est responsable d'une modification de la séquence du premier domaine trans-membranaire.

Marqueurs moléculaires de la résistance

Les marqueurs moléculaires de la résistance sont des indicateurs qui permettent de mettre en évidence la présence de mutations ou de modifications du génome connues ou réputées pour être associées à des phénotypes de résistance. Cependant, les raisons d'un échec thérapeutique ou de complications cliniques ne sont pas uniquement dues au génotype du parasite, les facteurs intervenant dans l'évolution du paludisme étant nombreux.

Les principaux marqueurs moléculaires de la résistance aux quinoléines sont associés aux gènes *Pfmdr1*, *Pfprt* et *cg2*.

Pfmdr1.

La découverte du gène *Pfmdr1* chez *Plasmodium falciparum* a fait penser que les mécanismes de la résistance à la chloroquine sont superposables à ceux de la résistance aux médicaments cytotoxiques sur les cellules de mammifères. Cependant, les résultats de nombreuses équipes ont démontré depuis que la relation entre le polymorphisme ou l'expression du gène *Pfmdr1* et la résistance n'est pas aussi directe. Que ce soit au niveau du gène *Pfmdr1*, de son transcriptome ou du protéome associé, des résultats variables

ou même contradictoires ont été obtenus par les différents auteurs (14, 15). De plus, par l'étude des clones issus d'un croisement génétique entre une souche chloroquine-sensible et une souche chloroquine-résistante, les gènes putatifs de la résistance ont été localisés sur une région de 36kb du chromosome 7 (16). Ce chromosome ne porte pas le gène *Pfmdr1*. Pourtant, l'étude de la variabilité du gène *Pfmdr1* au cours de nombreuses études cliniques, utilisant des isolats provenant de malades, a montré qu'un lien existe avec la résistance à certaines quinoléines. En particulier, la mutation *Pfmdr1* Tyr-86 est considérée par certains comme un marqueur moléculaire de la chloroquine-résistance (17). Il est certain que la recherche de ce marqueur isolément ne se justifie pas. La valeur prédictive de ce marqueur seul est très variable en fonction des zones géographiques et surtout de l'intensité de la transmission. Pourtant, le rôle de ce gène dans la résistance à la chloroquine et la pertinence de la mutation *Pfmdr1* Tyr-86 en tant que marqueur moléculaire doivent être pris en considération. En effet, des études récentes de transfection ont montré que le remplacement du gène mutant *Pfmdr1* par la séquence sauvage chez des parasites résistants diminue cette résistance d'un niveau élevé à un niveau modéré (18).

Le rôle du gène *Pfmdr1* est rendu plus complexe par l'analyse de son influence sur la sensibilité à d'autres antipaludiques tels que la méfloquine, l'halofantrine et les dérivés de l'artémisinine (19). Après avoir soumis *in vitro* des souches parasitaires à une pression de sélection par la méfloquine, Alan Cowman a montré une augmentation de taille (+ 100 à 200 kb) du chromosome 5 et la présence de 2 à 3 copies du gène *Pfmdr1*, pour une seule copie avant la sélection (7). Une augmentation de 2 à 4 fois du niveau de la Pgh1 était associée à ces modifications. La mutation *Pfmdr1* Tyr-86 n'était pas liée au mécanisme de résistance à la méfloquine. De façon surprenante, les clones devenus résistants à la méfloquine, à l'halofantrine et à la quinine, étaient également plus sensibles à la chloroquine, suggérant une relation inverse entre la résistance à ces antipaludiques et le niveau d'expression du gène *Pfmdr1*. L'implication de certaines mutations dans la séquence de *Pfmdr1* a été encore récemment démontrée *in vitro*, à propos de la résistance vis-à-vis de plusieurs aryl-amino-alcools (mefloquine, halofantrine, lumefantrine) et d'endopéroxydes (artémisine, artéflène, artémether) (20).

Des résultats obtenus en Thaïlande ont confirmé le lien entre l'amplification du gène *Pfmdr1* et la résistance à la méfloquine et l'halofantrine (21). En revanche, ces isolats de malades ne présentaient pas la mutation *Pfmdr1* Asn to Tyr-86. La même équipe a tenté d'utiliser ces marqueurs moléculaires pour prédire le phénotype de résistance des isolats. Le nombre de copies de *Pfmdr1* a permis de bien classer 48% des isolats résistants. L'adjonction de l'étude des mutations 86, 1034 et 1042 a produit 68% de bien classés. Il est important de noter que ce type de résultat est fortement dépendant des critères utilisés pour définir la résistance, et en particulier des seuils choisis pour classer les souches sensibles ou résistantes.

Si l'analyse de *Pfmdr1* doit être incluse dans une stratégie d'utilisation de marqueurs moléculaires de la résistance multiple, il est nécessaire d'associer la recherche de la mutation *Pfmdr1* Asn to Tyr-86 et la mesure de l'expression de *Pfmdr1*.

cg2.

Les premières études visant à établir un lien entre le polymorphisme complexe du gène *cg2* (génotype Dd2-like) et la résistance *in vivo*, réalisée sur de petites séries de patients, ont confirmé ce lien (22). Il apparaît dans cette étude que c'est l'association des 12 mutations ponctuelles qui est le facteur le plus déterminant, alors que le polymorphisme des régions répétées semble secondaire. La relation entre l'acquisition progressive de ces mutations ponctuelles par la pression de sélection et l'apparition de la résistance n'est pas clairement établie.

Il est intéressant de noter que certains isolats présentaient une association de clones mutés et non mutés, et que les premiers ont été sélectionnés par le traitement. Cette notion est importante à prendre en compte dans l'interprétation des études réalisées en zone de forte transmission où la présence de 3 à 4 clones différents chez un même patient est bien documentée. Il s'agit peut-être d'une des explications des résultats contradictoires obtenus par différents auteurs utilisant les mêmes marqueurs.

Une étude menée en Afrique du Sud a démontré que le lien entre le polymorphisme de longueur des séquences répétées *cg2* oméga n'est pas directement lié à la chloroquine-résistance (23).

La valeur prédictive de marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme de *cg2* apparaît donc très incertaine et le rythme des publications concernant ce gène se ralentit.

Pfcr.

Les données actuelles concernant les mutations du gène *Pfcr* retrouvées sur des isolats de malades ne permettent pas d'obtenir de conclusion définitive. Comme précédemment, les résultats peuvent être différents selon le niveau de transmission de la maladie et les paramètres choisis pour affirmer la résistance. Plusieurs études récentes donnent cependant un éclairage assez précis du rôle de *Pfcr* dans la résistance aux antipaludiques (24).

Une étude menée au Mali (25) a montré que, parmi une population où la grande majorité des patients répondait à un traitement par la chloroquine, la mutation *Pfcr* K76T était retrouvée dans 41 % des cas. Pourtant, cette mutation était présente dans tous les cas de paludisme survenant dans les deux semaines après le traitement. Il est donc probable que la chloroquine ait opéré une sélection des parasites présentant cette mutation, ce qui confirme la relation avec la chloroquinorésistance.

En revanche, dans une zone de plus forte transmission (26), la mutation *Pfcr* K76T a été systématiquement retrouvée dans plus d'une centaine d'échantillons sans qu'il soit possible d'établir un lien entre la présence de cette mutation et l'évolution sous traitement. Dans ces études, des tests de sensibilité *in vitro* n'ont pas été réalisés et la présence des mutations est analysée en fonction de la réponse *in vivo* selon le test OMS déjà décrit. Il semble donc probable, compte-tenu du fort niveau de transmission dans cette zone, que la réponse immunitaire des patients a largement contribué au succès thérapeutique indépendamment de la présence ou non de mutations ponctuelles.

D'autres résultats récents (27) ont montré une très bonne corrélation entre le phénotype de chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* et un polymorphisme dans la séquence de *Pfcr*. En particulier, la mutation *Pfcr* K76T a été retrouvée dans tous les isolats chloroquinorésistants et pas dans les isolats chloroquinorésistants testés dans cette étude. Une dizaine d'autres mutations ponctuelles ont été associées au phénotype de chloroquinorésistance sans qu'il soit possible de faire une relation entre la présence de ces autres mutations et le niveau de sensibilité à la chloroquine. Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs qui ont retrouvé, sur des souches provenant soit de Thaïlande, soit de Papouasie-Nouvelle Guinée, une relation entre la présence de la mutation *Pfcr* K76T et la mutation *Pfcr* A220S d'une vingtaine de souches différentes. Confirmant les

doutes exprimés par plusieurs équipes, ces auteurs n'ont pas retrouvé de polymorphisme complexe de résistance du gène *cg2* de ces mêmes isolats.

Au Soudan, une relation a été recherchée entre l'efficacité de la chloroquine et la présence des mutations *Pfcr* K76T et *Pfmdr1* Y86 (28). La sensibilité ou la résistance ont été déterminées par un test *in vivo* de 7 jours et par un test *in vitro*. Dans ces conditions, le lien recherché a été mis en évidence. Surtout, il a été montré un déséquilibre de liaison entre les deux mutations, indiquant que ces mutations intervenant sur 2 chromosomes différents sont transmises ensemble en cas de pression médicamenteuse.

Il ressort de l'ensemble de ces travaux que, si une relation directe ne peut pas être établie entre le nombre de mutations du gène *Pfcr* et la concentration minimale inhibitrice de chloroquine, en revanche, la présence de certaines mutations ponctuelles (K76T et A220S) peut être un bon marqueur moléculaire du phénotype de résistance.

Conclusion

La relation entre la présence d'une mutation ou d'un ensemble de mutations et l'évolution clinique du malade n'est pas simple. Les facteurs liés au malade (état de santé général, réponse immunitaire) et aux médicaments (qualité, dosage, observance) sont essentiels et ne peuvent être mesurés par les recherches de marqueurs moléculaires. L'expérience palustre du patient n'est donc pas prise en compte au cours des tests *in vitro* et de nombreuses incertitudes persistent concernant la relation entre la présence de certaines mutations et le phénotype de résistance. Des limitations d'ordre biologique apparaissent encore le potentiel prédictif des modifications génomiques. Par exemple, les méthodes courantes de biologie moléculaire ont tendance à ne mettre en avant que le génotype dominant dans une population de parasites. Les clones résistants peuvent donc ne pas être détectés par ces méthodes et être responsables d'une classification erronée de l'isolat.

Pourtant, les résultats obtenus par les nombreuses équipes travaillant dans ce domaine, démontrent que la recherche de marqueurs moléculaires prédictifs de la résistance est réaliste. Cependant, un travail important reste à faire concernant le choix des marqueurs et la standardisation des méthodes afin de pouvoir les appliquer à toutes les conditions de transmission et d'utilisation des antipaludiques.

REFERENCES

- 1 - WORLD HEALTH ORGANIZATION - Assessment of therapeutic efficacy for uncomplicated *falciparum* malaria in areas with intense transmission. Geneva, Switzerland : WHO/MAL/96.1077, 1996.
- 2 - WORLD HEALTH ORGANIZATION - Assessment of therapeutic efficacy of anti-malarial drugs for uncomplicated *falciparum* malaria. Geneva, Switzerland, 2001.
- 3 - KROGSTAD D.J., GLUZMAN I.Y., KYLE D.E. et Coll. - Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum* : mechanism of chloroquine resistance. *Science* 1987; **238a**: 1283-1285.
- 4 - GROS P., CROOP J., RONINSON A. VARSHAVSKY, HOUSMAN D.E. - Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multi-drug resistant hamster cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1986; **83** : 337-341.
- 5 - RUBIO J.P., COWMAN A.F. - The ATP-binding cassette (ABC) gene family of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 1996; **12** : 135-140.
- 6 - SAUNA Z.E., AMBUDKAR S.V. - Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2000; **97** : 2515-2520.
- 7 - COWMAN A.F., GALATIS D., THOMPSON J.K. - Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1994; **91** : 1143-1147.
- 8 - SU X., KIRKMAN L.A., FUJIOKA H., WELLEMS T.E. - Complex polymorphisms in an approximately 300 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997; **91** : 593-603.
- 9 - GERVAIS G.W., TRUJILLO K., ROBINSON B.L. et Coll. - *Plasmodium berghei* : identification of an *mdr*-like gene associated with drug resistance. *Exp. Parasitol.* 1999; **91** : 86-92.
- 10 - BASCO L.K., RINGWALD P. - Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. V analysis of the omega repetitive region of the *Plasmodium falciparum* *cg2* gene and chloroquine resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; **61** : 807-813.
- 11 - DURAND R., GABBETT E., DI PIAZZA J.P. et Coll. - Analysis of kappa and omega repeats of the *cg2* gene and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum* from sub-saharan africa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999; **101** : 185-197.

Synthèse Synthèse Synthèse

Durand et Coll. ont montré, au cours d'un travail réalisé à partir d'isolats de malades hospitalisés en France au retour d'un voyage (24 destinations différentes), qu'une certaine hiérarchie pourrait être établie dans la valeur prédictive de la présence des mutations les plus étudiées (29). Dans leur conditions expérimentales, il semble que la mutation *Pfcr* K76T, le génotype *cg2* kappa et la mutation *Pfmdr1* Tyr-86

soient présents respectivement dans 100 %, 80 % et 68 % des isolats chloroquino-résistants. Des résultats de même ordre ont été présentés par Djimdé et coll.

Quels sont les facteurs de régulation génomiques ou post-génomiques qui expliquent cette apparente hiérarchie ? Pourquoi ne retrouve-t-on pas une relation quantitative simple entre le nombre de mutations et la CI_{50} des souches, comme c'est le cas pour la résis-

tance aux antifoliques ? Les réponses sont encore spéculatives, mais ces données confortent l'idée que les mutations décrites sur les principaux gènes associés à la chloroquino-résistance ne sont que des témoins indirects d'un mécanisme orchestré par d'autres gènes. On peut raisonnablement croire que les gènes responsables de la résistance à la chloroquine restent à découvrir, avec leur cortège de marqueurs moléculaires ■

- 12 - FIDOCK D.A., NOMURA T., COOPER R.A. et Coll. - Allelic modifications of the *cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; **110** : 1-10.
- 13 - FIDOCK D.A., NOMURA T., TALLEY A.K. et Coll. - Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell.* 2000; **6** : 861-871.
- 14 - FOOTE S.J., THOMPSON J.K., COWMAN A.F., KEMP D.J. - Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Cell.* 1989; **57** : 921-930.
- 15 - WILSON C.M., SERRANO A.E., WASLEY A. et Coll. - Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 1989; **244** : 1184-1186.
- 16 - WELLEMS T.E., WALKER-JONAH A., PANTON L.J. - Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88** : 3382-3386.
- 17 - ADAGU I.S., WARHURST D.C. - Association of *cg2* and *pfmdr1* genotype with chloroquine resistance in field samples of *Plasmodium falciparum* from Nigeria. *Parasitology* 1999; **119** : 343-348.
- 18 - REED M.B., SALIBA K.J., CARUANA S.R. et Coll. - Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2000; **403** : 906-909.
- 19 - DURAISINGH M.T., JONES P., SAMBOU I. et Coll. - The tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; **108** : 13-23.
- 20 - DURAISINGH M.T., ROPER C., WALLIKER D., WARHURST D.C. - Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 2000; **36** : 955-961.
- 21 - PRICE R.N., CASSAR C., BROCKMAN A. et Coll. - The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; **43** : 2943-2949.
- 22 - BASCO L.K., RINGWALD P. - Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and polymorphism of the *cg2* gene. *J. Infect. Dis.* 1999; **180** : 1979-1986.
- 23 - McCUTCHEON K.R., FREESE J.A., FREAN J.A. et Coll. - Chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum* with alternative *cg2* omega repeat length polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; **62** : 190-192.
- 24 - MAYOR A.G., GOMEZ-OLIVE X., APONTE J.J. et Coll. - Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J. Infect. Dis.* 2001; **183** : 1413-1416.
- 25 - DJIMDE A., DOUMBO O.K., CORTESE J.F. et Coll. - A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 2001; **344** : 257-263.
- 26 - DORSEY G., KAMYA M.R., SINGH A., ROSENTHAL P.J. - Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* *pfcr* and *pfmdr1* Genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J. Infect. Dis.* 2001; **183** : 1417-1420.
- 27 - CHEN N., RUSSEL B., STALEY J. et Coll. - Sequence polymorphisms in *pfcr* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* 2001; **183** : 1543-1545.
- 28 - BABIKER H.A., PRINGLE S.J., ABDEL-MUHSIN A. et Coll. - High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *J. Infect. Dis.* 2001; **183** : 1535-1538.
- 29 - DURAND R., JAFARI S., VAUZELLE J. et Coll. - Analysis of *pfcr* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem Parasitol.* 2001; **114** : 95-102.