Marqueurs moléculaires des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques

Eboumbou Moukoko EC[1,2,3], Bogreau H[2], Briolant S[2], Pradines B[2], Rogier C[2]

1. Département dessciences biologiques, Faculté de médecine et des sciences pharmaceutiques, Université de Douala, BP2701, Douala, Cameroun.
2. Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires, Institut de Recherche Biomédicale des Armées - Antenne de Marseille (ex-IMTSSA) & Unité de recherche en maladies infectieuses et tropicales émergentes,UMR6236, Marseille, France.
3. Department of medical laboratory science, Faculty of health sciences, University of Buea, Cameroon.

Med Trop 2009 ; **69** : 606-612

RÉSUMÉ • Les principaux gènes de *Plasmodium falciparum* connus pour être associés à la résistance à des antipaludiques sont *pfcrt*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps, pfcytb, pfmrp, pfnhe-1, pfmdt, pfserca et pftetQ*. Les résistances à la chloroquine, l'amodiaquine, la méfloquine, la sulfadoxine-pyriméthamine, le cycloguanil et l'atovaquone ont des marqueurs moléculaires validés qui permettent de prédire leur efficacité parasito-clinique (*i.e.* tests *in vivo*). Ces marqueurs moléculaires ont de nombreux avantages. Ils permettent d'évaluer de nombreux échantillons en moins de temps que les tests *in vivo* ; la collecte, le transport et la conservation des échantillons sont beaucoup plus aisés que pour les tests *in vitro*. Ils peuvent servir à la surveillance épidémiologique des résistances à l'échelle d'un pays et à la prédiction individuelle des succès thérapeutiques. Le développement des méthodes de biologie moléculaire à haut débit, la disponibilité des séquences nucléotidiques de génomes de *P. falciparum* et la collaboration étroite entre chercheurs fondamentaux, cliniciens et responsables des programmes nationaux de lutte contre le paludisme sont les principaux atouts de la recherche et du développement des marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques.

MOTS-CLÉS • Paludisme. *Plasmodium falciparum*. Résistance. Médicaments. Marqueurs.

MOLECULAR MARKERS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* DRUG RESISTANCE

ABSTRACT • The main *Plasmodium falciparum* genes known to be associated with drug resistance are *pfcrt, pfmdr1, pfdhfr, pfdhps, pfcytb, pfmrp, pfnhe-1, pfmdt, pfserca* and *pftetQ*. Molecular markers for resistance to chloroquine, amodiaquine, mefloquine, sulfadoxine-pyrimethamine, cycloguanil and atovaquone have been validated and used to predict the parasitological and clinical efficacy of these drugs (*i.e.* based on *in vivo* tests). These molecular markers have numerous advantages. They allow evaluation of large series of samples in less time than *in vivo* tests. Collection, transport and storage of samples are much easier than for *in vitro* tests. These markers can be used for epidemiological monitoring of resistance for an entire country as well as for prediction of therapeutic outcome for a single individual. Development of high-throughput molecular biology techniques, availability of the nucleotidic sequences of *P. falciparum* genomes, and close collaboration between fundamental researcher workers, clinical practitioners, and officials in charge of the national malaria control programs are major assets in the research and development of molecular markers for *P. falciparum* resistance to antimalarial drugs.

KEY WORDS • Malaria. *Plasmodium falciparum*. Resistance. Anti-malarial drugs. Markers.

Maladie liée à la pauvreté et cause de celle-ci, le paludisme touche non seulement la santé de milliards d'individus à travers le monde mais affecte également la richesse des pays déjà pauvres où il sévit de manière endémique. On estime à plus de 2 milliards le nombre d'individus exposés au paludisme dans le monde (1) et à plus de 9 milliards d'euros la perte annuelle de PIB due au paludisme en Afrique subsaharienne, région la plus touchée. *Plasmodium falciparum* est l'espèce plasmodiale responsable de la plus grande partie de la létalité attribuable au paludisme et serait directement responsable de près de 2 millions de décès par an sur environ 500 millions de cas, principalement des enfants âgés de moins de 5 ans (1, 2). La résistance de ce parasite à la chloroquine qui a été le médicament de première ligne pour prévenir et traiter le paludisme pendant plus de 30 ans, s'est accompagnée d'une augmentation dramatique de la mortalité (3-5). En concertation avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les responsables des Programmes nationaux de lutte contre le paludisme (PNLP) ont opté pour la mise en place des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) visant à retarder l'émergence de résistances et permettant de traiter efficacement et rapidement les infections plasmodiales (6). L'utilisation des ACT s'est accompagnée d'une diminution drastique de la morbidité et de la mortalité par paludisme dans de nombreuses zones d'endémie (1, 7). Mais déjà, les premiers cas d'échecs cliniques aux ACT sont identifiés en Asie du Sud-Est (8). Ces variations du poids du paludisme en fonction des résistances de *P. falciparum* et de la disponibilité de médicaments auxquels ce parasite est sensible démontrent l'importance majeure de la surveillance des résistances et du maintien de l'accès à des traitements efficaces.

Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antiplasmodiaux et la mise en place effective par les systèmes de santé de combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les ACT (8-10). Ceci s'explique d'abord par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome et par les masses très

• *Correspondance : elsecarole@yahoo.fr*
• *Article reçu le 31/08/2009, définitivement accepté le 22/10/2009.*

importantes de parasites portées par les individus infectés. Même si les mutations capables de conférer une résistance à un nouveau médicament sont extrêmement rares et peu probables, le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finissent par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse. Ainsi, les autres facteurs favorisant l'émergence de résistances sont i) une mauvaise utilisation des antipaludiques par les populations infectées (automédications abusives, mauvaise observance) conduisant à des traitements incomplets, ii) une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapies et iii) la consommation de contrefaçons sous dosées, facteurs permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister. Ainsi, des résistances ont émergé contre la majorité des antipaludiques dans la plupart des régions endémiques. Cela concerne aussi bien les anciennes molécules ayant longtemps été utilisées en monothérapie (chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine, méfloquine) que certaines des nouvelles molécules utilisées en bithérapie (atovaquone, artesunate, luméfantrine).

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour surveiller la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques et objectiver sa résistance (3). L'OMS a défini en 1965 et 1973 la résistance comme la capacité du parasite à survivre et/ou à se multiplier en dépit de l'administration et de l'absorption d'un médicament donné à doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de la tolérance du malade (11, 12). Il a été ajouté en 1986 que la forme active du médicament devait pouvoir atteindre le parasite ou accéder à l'intérieur de l'érythrocyte infecté pendant la durée nécessaire à son action normale. Il s'agissait de tenir compte du fait que les individus pouvaient différer par leur capacité à métaboliser les antipaludiques comme les sulfonamides et les sulfones, que les molécules antipaludiques pouvaient se lier fortement aux protéines plasmatiques et que des médicaments administrés de façon simultanée pouvaient avoir un effet antagoniste sur l'efficacité de l'antipaludique (e.g. l'acide folique peut altérer l'effet de la sulfadoxine-pyriméthamine). Pour des raisons historiques et pratiques, la définition de la résistance est donc essentiellement clinique et parasitologique. L'OMS a fait des efforts considérables pour standardiser les méthodes d'évaluation d'efficacité de médicaments antipaludiques pendant les 40 dernières années, mais les recommandations les concernant ont changé plusieurs fois, en fonction de l'avis des experts de chaque époque. La méthode de référence de diagnostic et de surveillance des résistances est donc le test *in vivo* de l'OMS développé en 1965 et révisé en 1967, en 1972, en 1996 et enfin en 2001 (3). Leur confirmation exige la preuve 1) que les parasites sont recrudescents chez un patient qui a récemment reçu le traitement à dose adaptée et 2) que la concentration sanguine efficace du médicament ou de ses métabolites actifs a été maintenue pour au moins quatre cycles parasitaires (3). En effet, des résistances apparentes peuvent en fait être dues à des différences interindividuelles de pharmacocinétique des antipaludiques testés. C'est le cas par exemple de l'atovaquone, la méfloquine, l'halofantrine et la luméfantrine. Les tests *in vivo* consistent à administrer une dose standard d'antipaludique à des malades infectés par *P. falciparum* et à suivre pendant au moins 28 jours la disparition des manifestations cliniques et de la parasitémie. Les principales limitations des tests *in vivo* sont leur dépendance à 1) l'observance thérapeutique, la posologie et la qualité des médicaments qui doivent normalement être strictement contrôlées au cours des essais, 2) les variations interindividuelles de pharmacocinétique (absorption, élimination, biotransformation-métabolisme du médicament absorbé), 3) l'immunité naturellement acquise des individus qui biaise les résultats vers une meilleure efficacité thérapeutique, 4) l'état nutritionnel du patient qui influence très souvent la pharmacocinétique de l'antipaludique et 5) la sensibilité et la spécificité du diagnostic parasitologique des rechutes ou de l'absence de clairance parasitaire ainsi que de la distinction entre véritable rechute et nouvelle infection.

Les tests *in vivo* impliquent le suivi prolongé d'individus (≥28 jours) et donc une logistique importante et des ressources humaines qualifiées pour ce type d'étude clinique. Ils ne permettent de tester qu'un seul médicament par individu et qu'un petit nombre de médicaments par étude.

Les tests *in vitro* (*i.e.* inhibition de la croissance des parasites en culture par des concentrations déterminées d'antipaludiques) permettent d'étudier simultanément la sensibilité de *P. falciparum* à plusieurs antipaludiques en faisant abstraction des facteurs liés au patient comme l'immunité naturellement acquise, l'état nutritionnel, l'observance du traitement et la pharmacocinétique de l'antipaludique. Ils sont cependant chers et complexes à mettre en œuvre, ils nécessitent des infrastructures importantes, des personnels très qualifiés et spécialisés et nécessitent de plus de disposer des parasites vivants. Cela implique des délais brefs de réalisation après le prélèvement des souches et le respect de règles strictes de biosécurité. Par ailleurs, leurs résultats n'ont pas toujours été corrélés aux résultats des tests *in vivo* et ne sont pas toujours reproductibles d'une équipe à l'autre en raison de différences entre les techniques et les protocoles utilisés. Pour ces raisons, les tests *in vitro* sont utilisés pour la surveillance de la chimiosensibilité mais n'ont pas d'utilité en clinique.

Il existe enfin des tests «moléculaires». Il s'agit des méthodes de génotypage (*i.e.* d'identification des variants génétiques) réalisées sur l'ADN du parasite. Ces méthodes ont profité de l'essor de la biologie moléculaire et de la connaissance récente du génome de *P. falciparum*. Il s'agit de chercher les modifications des gènes du parasite impliqués dans sa résistance aux antipaludiques. La description des marqueurs moléculaires des résistances de *P. falciparum* actuellement utilisés ou investigués est l'objet de la présente revue.

Marqueurs de résistance

Les marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* sont présentés par antipaludique dans le tableau 1.

P. falciparum chloroquine-resistance transporter gene (*pfcrt*)

Le gène *pfcrt* (chromosome 7) code une protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive où s'accumule normalement la chloroquine. La mutation Lys76Thr du gène *pfcrt* (*i.e.* remplacement d'un acide aminé lysine par une thréonine au niveau du codon 76) est associée à la résistance à la chloroquine au point qu'elle est présente dans toutes les souches résistantes (3). La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la chloroquine par 7,2 (odds ratio, OR ; Intervalle de confiance à 95 %, IC 95 % : 4,5-11,5, méta analyse de 12 études) sur un suivi de 28 jours et par 2,1 (OR ; IC 95 % : 1,5-3,0, méta analyse de 13 études) sur un suivi de 14 jours (13). Cette mutation est souvent associée à d'autres mutations du même gène (Cys72Ser, Met74Ile, Asn75Glu, Ala220Ser, Gln271Glu, Asn326Ser, Ile356Thr,

Tableau 1. Marqueurs moléculaires de résistance de P. falciparum selon les antipaludiques.

Médicament	Marqueur de résistance		Niveau de validation*
	Gène ou locus	Allèle associé à la résistance ou à la diminution de sensibilité	
Chloroquine	*pfcrt*	Lys76Thr	*in vivo*
	pfmrp	His191Tyr et Ser437Ala	*in vitro*
Amodiaquine	*pfmdr1*	Asn86Tyr	*in vivo*
	pfmrp	His191Tyr et Ser437Ala	*in vitro*
Méfloquine	*pfmdr1*	Nombre de copie > 1	*in vivo*
Sulfadoxine-Pyriméthamine	*pfdhfr*	Ser108Asn	*in vivo*
	pfdhfr	Triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg	*in vivo*
	pfdhps	Ala437Gly	*in vivo*
	pfdhps	Double mutation : Ala437Gly + Lys540Glu	*in vivo*
	pfdhfr *pfdhps*	Quintuple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile + Cys59Arg + Ala437Gly + Lys540Glu	*in vivo*
	pfmrp	Lys1466Arg	*in vivo*
Proguanil (cycloguanil)	*pfdhfr*	Ser108Thr + Ala16Val	*in vivo*
	pfdhfr	Double/triple mutation : Ser108Asn + Asn51Ile et/ou + Cys59Arg	*in vivo*
Atovaquone	*pfcytb*	Tyr268Asn ou Tyr268Ser	*in vivo*
Luméfantrine	*pfmdr1*	Asn86 & Nombre de copie > 1	Sélection d'allèle en cas d'échec thérapeutique
Quinine	*pfnhe-1 (ms4760)*	Nombre de motifs : DNNND > 2 ou NHNDNHNNDDD < 3	Association *in vitro*
	pfmrp	His191Tyr et Ser437Ala	*in vitro*
Doxycycline	*pftetQ*	Nombre de motif KYNNNN < 3	Association *in vitro*
	pftetQ	Nombre de copie > 1	Association *in vitro*
	pfmdt	Nombre de copie > 1	Association *in vitro*
Artéméther	*pfserca*	Ser769Asn	Association *in vitro* en Guyane

* : *in vivo*, associé à la résistance *in vivo*.

Arg371Ile) dont les rôles ne sont pas clairement connus. Elles pourraient compenser l'effet de la mutation en position 76 sur la capacité du parasite à se multiplier (fitness). L'existence de souches de *P. falciparum* sensibles à la chloroquine et portant cependant la mutation Lys76Thr suggère que d'autres gènes pourraient être impliqués dans la résistance à la chloroquine. La mutation de *pfcrt* a aussi été associé à la résistance *in vitro* à la quinine (14).

P. falciparum multidrug-resistance 1 gene (*pfmdr1*)

Le gène *pfmdr1* (chromosome 5) code la P-glycoprotein homologue (*Pgh1*), une protéine de la superfamille des ABC transporteurs, homologue des pompes d'efflux de médicaments présentes dans des cellules résistantes aux anticancéreux (15). Sa mutation Asn86Tyr a été associée à la résistance à l'amodiaquine (3). La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à l'amodiaquine par 5,4 (OR ; IC 95 % : 2,6-11,2, méta analyse de 6 études) (13) et par OR=7,9 ($p < 0,01$) le risque d'échec thérapeutique par la combinaison amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine (16). Inversement, la version non mutée du codon 86 (*pfmdr1* Asn86) était sélectionnée par des traitements par la combinaison artéméther-luméfantrine (17, 18), suggérant qu'elle pourrait être un marqueur de résistance à la luméfantrine (3).

La mutation Asn86Tyr a aussi été associée à la résistance à la chloroquine dans certaines études et pas dans d'autres. La présence de cette mutation est associée à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la chloroquine par 2,2 (OR ; IC 95 % : 1,6-3,1, méta analyse de 11 études) sur un suivi de 14 jours et par 1,8

(OR ; IC 95 % : 1,3-2,4, méta analyse de 11 études) sur un suivi de 28 à 42 jours (13). Ces associations étaient cependant considérées comme fragiles. En effet, dans plusieurs études, la mutation Asn86Tyr a été trouvée préférentiellement associée à la mutation Lys76Thr du gene *pfcrt*. La combinaison de ces deux mutations (*pfmdr1* Asn86Tyr + *pfcrt* Lys76Thr), multiplie le risque de résistance *in vivo* à la chloroquine par 3,9 (OR ; IC 95 % : 2,6-5,8, méta analyse de 5 études) (13), ce qui ne diffère pas de ce qui a été observé pour la mutation *pfcrt* Lys76Thr prise isolément (OR de 2,1 à 7,2, cf. supra). Le rôle du gène *pfmdr1* dans la résistance à la chloroquine, est donc controversé et ne peut être que limité (3, 15).

En plus de la mutation Asn86Tyr, d'autres mutations du gène pfmdr1 ont été identifiées (Tyr184Phe, Ser1034Cys, Asn1042Asp, Asp1246Tyr). L'introduction expérimentale de mutations a été associée *in vitro* à une résistance à la quinine (14, 19) et à une augmentation de la sensibilité à la méfloquine, l'halofantrine, la luméfantrine et aux dérivés de l'artémisinine (3, 15). Le rôle de ces mutations n'a pas été clairement confirmé sur le terrain, en particulier la résistance aux dérivés de l'artémisinine qui émerge actuellement à la frontière Thaïlande - Cambodge n'est pas associée au gène *pfmdr1* (8).

L'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* (de 1 à 2 copies ou plus) a été associée à la résistance aux endoperoxides (dérivés de l'artémisinine ; évidences *in vitro*) et aux arylaminoalcools comme la méfloquine, l'halofantrine ou la luméfantrine (15, 20), avec un risque de résistance *in vivo* à la méfloquine multiplié par 8,6 (OR ; IC 95 % : 3,3-22,9) et à un risque significativement élevé de résistance *in vivo* à l'association artésunate-méfloquine (13, 21). Mais l'association entre diminution de sensibilité à la méfloquine et augmentation du nombre de copies de *pfmdr1* n'a jamais été montrée pour des souches provenant du continent Africain. Lorsque le nombre de copie du gène *pfmdr1* est augmenté, sa séquence nucléotidique est généralement dépourvue de mutation (allèle dit «sauvage») (15). Les résistances à l'amodiaquine (associées à la mutation Asn86Tyr et à une copie unique du gène *pfmdr1* dans le génome du parasite) et à la méfloquine ou la luméfantrine (associées à une augmentation du nombre de copie du gène *pfmdr1*, sans mutation) semblent sélectionnées de façon opposées (15, 17).

P. falciparum dihydrofolate reductase gene (pfdhfr)

pfdhfr est le gène (chromosome 4) qui code la dihydrofolate reductase (DHFR), une enzyme de la voie des folates qui est essentielle à la synthèse de l'ADN. Elle est inhibée par les antifoliniques comme la pyriméthamine et le cycloguanil dont elle est la cible moléculaire (22, 23). La mutation Ser108Asn du gène de la DHFR est associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (3, 22, 23). La présence de cette mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la sulfadoxine-pyriméthamine par 2,2 (OR ; IC 95 % : 1,4-3,3, méta analyse de 18 études) (13). Les mutations additionnelles Asn51Ile, Cys59Arg ou Ile164Leu augmentent cette résistance, l'association des quatre mutations étant responsable du niveau le plus élevé de résistance aux antifoliniques et à l'association sulfadoxine-pyriméthamine. La triple mutation des codons 108, 51 et 59 est souvent observée en Afrique ou en Asie chez les souches résistantes à la sulfadoxine-pyriméthamine. Cette triple mutation multiplie le risque de résistance *in vivo* à la sulfadoxine-pyriméthamine par 4,3 (OR ; IC 95 % : 3,0-6,3, méta analyse de 16 études) (13). C'est généralement cette triple mutation qui est considérée comme le meilleur facteur prédictif de la résistance *in vivo* à la sulfadoxine-pyriméthamine. La détection de la mutation Ser108Asn est quant à elle prédictive de la présence des deux autres mutations. En Amérique du Sud, la mutation du codon 59 est moins fréquente et la mutation Cys50Arg la remplacerait. La mutation Ile164Leu mais aussi les mutations Asn188Lys, Ser189Arg et Val213Ala, sont plus rares et peuvent être associées à des niveaux élevés de résistance à la pyriméthamine.

La combinaison des mutations Ser108Thr et Ala16Val est associée à la résistance au cycloguanil (métabolite actif du proguanil) sans être associée à la résistance à la pyriméthamine (3, 22). La mutation Ser108Asn isolée n'est pas associée à la résistance au cycloguanil mais sa combinaison avec les autres mutations de la DHFR (codons 51, 59 et 164), est généralement associée à une résistance au cycloguanil.

P. falciparum dihydropteroate synthase gene (*pfdhps*)

La dihydroptéroate synthase (DHPS) est une autre enzyme de la voie des folates qui est inhibée par les sulfones et sulfamides comme la sulfadoxine et la dapsone dont elle est la cible moléculaire (3, 15, 22, 23). Les antifoliniques et les sulfamides agissant à deux niveaux de la même voie métabolique. Cela explique l'effet synergique qu'ils ont en association (22, 23). Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* confèrent une résistance à la sulfadoxine. En particulier, la mutation isolée Ala437Gly et la double mutation Ala437Gly + Lys540Glu sont respectivement associées à une multiplication du risque de résistance *in vivo* à la sulfadoxine-pyriméthamine par 1,5 (OR ; IC 95 % : 1,0-2,4, méta analyse de 12 études) et 3,9 (OR ; IC 95 % : 2,6-5,8, méta analyse de 10 études) (13). Les mutations Ala581Gly et Ala613Thr/Ser sont rares, en particulier en Afrique, mais pourraient être associées à des degrés élevés de résistance.

La combinaison de la triple mutation *dhfr Ser108Asn* + Asn51Ile + Cys59Arg et de la double mutation dhps Ala437Gly + Lys540Glu («quintuple mutation») multiplie le risque de résistance *in vivo* à la sulfadoxine-pyriméthamine par 5,2 (OR ; IC 95 % : 3,2-8,8, méta analyse de 3 études) (13).

P. falciparum cytochrome b gene (*pfcytb*)

pfcytb (génome mitochondrial) code le cytochrome b qui est la cible moléculaire de l'atovaquone. Ses mutations Tyr268Asn et Tyr268Ser induisent une diminution très importante de la sensibilité du cytochrome b à l'atovaquone et sont associées à la résistance du parasite à cette molécule (3, 24, 25). Ces mutations sont très rares dans les populations générales de *P. falciparum* et elles ne sont généralement détectées qu'à l'occasion des échecs thérapeutiques ou prophylactiques de la combinaison atovaquone-proguanil (24-26).

P. falciparum sodium/hydrogen exchanger gene (*pfnhe-1*)

pfnhe-1 code une protéine de transport de protons (H^+) qui pourrait réguler le pH cytoplasmique ou de la vacuole digestive du parasite. Des perturbations de ce pH liées à ce transporteur pourraient altérer l'activité de la quinine (27). Des répétitions en tandem de motifs peptidiques de *pfnhe-1* (codé par la région microsatellite intragénique ms4760) ont été trouvées associées à des diminutions de sensibilité *in vitro* d'isolats ou de clones de *P. falciparum* adaptés à la culture (28, 29). Si ces observations sont confirmées *in vivo*, les profils de répétitions pourraient devenir des marqueurs moléculaires de baisse de sensibilité ou de résistance à la quinine.

***P. falciparum* multidrug resistance associated protein gene (*pfmrp*)**

Le gène *pfmrp* (chromosome 1) code un ABC transporteur de la membrane vacuolaire qui pourrait être un transporteur de glutathion conjugué aux catabolites toxiques de la dégradation de l'hème (30, 31). Deux mutations His191Tyr et Ser437Ala semblent être associées à une diminution de sensibilité *in vitro* à la chloroquine, à la quinine et à l'amodiaquine (14, 32-34). De plus, une autre mutation Lys1 466Arg serait impliquée dans la sensibilité à l'association sulfadoxine-pyriméthamine (35). *pfmrp* serait aussi un transporteur de folates et la forme mutée 1 466Arg permettrait un efflux plus important des folates intraérythrocytaires, diminuant ainsi la compétition entre les folates et la pyriméthamine.

***P. falciparum* sarco-endoplasmic reticulum calcium *ATPase6* (*pfserca*)**

pfserca code la sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase6 qui avait été identifiée expérimentalement comme une cible possible des dérivés de l'artémisinine. En 2002-2003, la mutation Ser769Asn de ce gène a été trouvée associée à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à l'artéméther (concentration inhibitrice 50% >30 nmol/L) en Guyane mais pas au Cambodge ni au Sénégal (36). Cette mutation n'a pas été trouvée associée à la résistance *in vivo* à l'artésunate à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande (8).

***P. falciparum* tetracycline resistance TetQ gene (*pftetQ*) et *P. falciparum* multidrug transporter gene (*pfmdt*)**

pftetQ coderait une protéine de la famille des GTPases et possède des similitudes avec des gènes impliqués dans la résistance de bactéries aux cyclines. *pfmdt* coderait une protéine de transport membranaire de médicaments analogue à la tetracycline resistance protein TetA, une pompe d'efflux responsable de la résistance de bactéries à la doxycycline. Un nombre de copies supérieur à un du gène *pftetQ* ou du gène *pfmdt*, ainsi qu'un nombre de répétitions inférieur à trois d'un motif de six acides aminés (KYNNNN) de la protéine codée par *pftetQ* ont été trouvés associés à une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la doxycycline (37-39). Aucune résistance *in vivo* de *P. falciparum* à la doxycycline n'a cependant encore été décrite à ce jour (37, 40).

Méthodes de génotypage

Les méthodes de génotypage font généralement appel à la PCR (polymerase chain reaction) pour amplifier les portions d'ADN porteuses de mutations ou dont le nombre de copies est associé aux résistances. La méthode de séquençage reste la méthode de référence pour mettre en évidence les mutations et en particulier les mutations ponctuelles. Son coût fait privilégier d'autres méthodes. La présence des mutations ponctuelles (*i.e.* mutations n'affectant qu'un nucléotide) est le plus souvent révélée par restriction enzymatique (RFLP) à l'aide d'enzymes capables de reconnaître les séquences nucléotidiques spécifiques des allèles résistants ou sensibles et de cliver l'ADN lorsque ces séquences sont présentes (*i.e.* le clivage du fragment d'ADN amplifié signe la présence de l'allèle). L'électro-migration de l'ADN sur gel d'agarose permet de distinguer par leur taille les fragments d'ADN clivés et non clivés. Elle peut aussi être révélée par élongation d'amorce avec des nucléotides marqués spécifiques des allèles recherchés. Les séquenceurs automatiques permettent aussi de distinguer les fragments d'ADN de tailles différentes ou marqués par des nucléotides couplés à des fluorochromes spécifiques d'allèles (e.g. par élongation d'amorce).

D'autres méthodes plus sophistiquées existent et permettent aujourd'hui d'étudier les mutations ponctuelles sur l'ensemble du génome plasmodial. Certaines font appel à des puces à ADN pour le génotypage dont les sondes fixées sur un support solide s'hybrident spécifiquement avec les fragments d'ADN ayant la séquence de chaque allèle recherché. L'évaluation du nombre de copies de gènes classiquement effectuée par PCR quantitative en temps réel est également possible à l'aide de puce à ADN sur l'ensemble du génome. L'estimation des nombres de répétitions de motifs nucléotidiques est possible par séquençage mais la multiplicité des infections (plusieurs populations de *P. falciparum* présentes simultanément dans le sang du patient) limite l'intérêt de cette technique et lui fait préférer l'AFLP (amplified fragment-length polymorphism).

Avantages et limites des marqueurs moléculaires des résistances

Les principaux avantages des marqueurs moléculaires sont les suivants :

1. Ils ne nécessitent que de disposer de l'ADN parasitaire, pas des parasites vivants. Cela permet de limiter les problèmes de biosécurité et les contraintes de chaîne du froid ou de logistiques qu'implique l'étude *in vitro* des souches. Le recueil, le transport et la conservation de l'ADN peuvent être effectués sur des supports buvards traités pour assurer la conservation des acides nucléiques (ADN et ARN) et détruire les agents pathogènes. La conservation de l'ADN peut être assurée, selon les supports, à température ambiante ou à -20°C. La dessiccation complète des échantillons est un facteur déterminant de la conservation de l'ADN sur buvard.

2. Ils permettent des études transversales des résistances sans nécessiter un suivi longitudinal prolongé de patients (tests *in vivo*). Cela peut être utile pour les évaluations des résistances dans les zones reculées ou dangereuses dans lesquelles les équipes d'investigation ne peuvent pas rester (41).

3. Ils font appel à des méthodes de génotypage généralement simples et robustes (*i.e.* reproductibles), plus faciles à mettre en œuvre que les tests *in vitro*. C'est le cas notamment des marqueurs de résistances aux antifoliniques, sulfones et sulfamides dont l'évaluation *in vitro* est délicate (utilisation de milieux spéciaux) ou des molécules peu solubles.

4. Ils permettent d'évaluer la sensibilité à plusieurs familles d'antipaludiques sur le même échantillon alors que les tests *in vivo* ne permettent de tester qu'un médicament par individu.

5. Leurs résultats ne dépendent pas des facteurs liés à l'individu comme l'immunité acquise, contrairement à ceux des tests *in vivo*.

6. Ils donnent des indications précises sur la prévalence des populations plasmodiales prédites comme résistantes, y compris lorsque les patients sont infectés à la fois par des parasites sensibles et des parasites résistants (infections multiples). Ils peuvent donc être à la base de systèmes d'alerte précoce de l'émergence des résistances capables de détecter des variations temporelles ou spatiales des résistances indétectables par les autres méthodes de surveillance (42). En effet, l'implantation des marqueurs de résistance

dans une population plasmodiale précède la hausse du niveau de résistance *in vivo*. Ces marqueurs sont prédictifs de l'apparition ou de l'augmentation du niveau de résistance. Leur utilisation peut permettre i) d'anticiper l'apparition des résistances *in vivo* au niveau populationnel et ii) de mieux comprendre les facteurs déterminant leur implantation et la propagation des résistances dans les populations plasmodiales (43).

Les principales limites des marqueurs moléculaires sont les suivantes :

1. Les marqueurs moléculaires prédictifs des échecs thérapeutiques *in vivo* sont peu nombreux car leur identification et leur validation sont difficiles, et intéressent parfois des molécules qui sont peu utilisées ou qui ne devraient plus l'être (e.g. la chloroquine). Cela limite leur intérêt (43).

2. Bien qu'associés significativement avec la résistance, les marqueurs moléculaires ont généralement un pouvoir prédictif limité des échecs thérapeutiques en raison, notamment des autres facteurs déterminants comme l'immunité acquise ou les variations interindividuelles de pharmacocinétique. En règle générale, l'absence de l'allèle résistant (*i.e.* mutation) est associée à une forte probabilité de succès thérapeutique (*i.e.* bonne spécificité du diagnostic de résistance *in vivo*), mais la présence de l'allèle résistant n'est associé qu'à une probabilité modérée ou faible d'échec thérapeutique (*i.e.* mauvaise sensibilité du diagnostic de résistance *in vivo*). Chez des individus maliens immuns, la mutation de la position 76 de la *pfcrt* n'était associée à un échec thérapeutique que dans un tiers des cas (44). Cela avait incité les auteurs à élaborer un index corrigeant les estimations de la prévalence de la résistance *in vivo* à la chloroquine à partir du marqueur moléculaire ; cet index devant être étalonné pour chaque situation épidémiologique.

3. Les méthodes de génotypage utilisées relèvent encore des laboratoires spécialisés, en particulier dans la plupart des zones d'endémie. Cependant, les méthodes de PCR, de RFLP, d'élongation d'amorce, de PCR quantitative en temps réel et de séquençage se sont démocratisées et sont maintenant accessibles à de nombreux laboratoires hospitalo-universitaires.

Conclusion

Les marqueurs moléculaires de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques ont de nombreux avantages (43). Ils permettent d'évaluer de nombreux échantillons en beaucoup moins de temps que les tests *in vivo* ; et la collecte, le transport et la conservation des échantillons est beaucoup plus aisée que pour les tests *in vitro*. Ils peuvent servir à la surveillance épidémiologique des résistances à l'échelle d'un pays ou de la planète comme cela est proposé par le projet WARN (43, 45), à l'étude des déterminants de leur émergence et de leur diffusion et à la prédiction individuelle des succès thérapeutiques. Les marqueurs moléculaires des résistances sont généralement identifiés initialement sur la base de corrélations entre les génotypes parasitaires et la sensibilité *in vitro* de clones ou d'isolats de *P. falciparum*. Leur utilité doit cependant être validée par rapport à l'efficacité thérapeutique parasito-clinique des antipaludiques (*i.e.* par tests *in vivo*). Le développement des méthodes de biologie moléculaire haut débit, la disponibilité des séquences nucléotidiques de génomes de *P. falciparum* et la collaboration étroite entre chercheurs fondamentaux, cliniciens et responsables des programmes nationaux de lutte contre le paludisme sont les principaux atouts pour le développement de marqueurs moléculaires de résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques. Cela devrait faciliter l'identification et la validation de marqueurs moléculaires de la résistance à l'artésunate et aux autres dérivés de l'artémisinine.

Références

1. WHO. The world malaria report 2008. Geneva : World Health Organization ; 2008. Report No. : WHO/HTM/GMP/2008.1.
2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005 ; 434 : 214-7.
3. WHO. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs : report on global monitoring : 1996-2004. World Health Organisation ed, Geneva, 2005. Report No. : WHO/HTM/MAL/2005.1103.
4. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrees du Lou A, Delaunay V, *et al.* Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. C R Acad Sci III 1998 ; 321 : 689-97.
5. Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 64 : 12-7.
6. Ogbonna A, Uneke CJ. Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated malaria in sub-Saharan Africa : the efficacy, safety, resistance and policy implementation since Abuja 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 ; 102 : 621-7.
7. Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, Mufunda J, Abdulmumini U, Ogbamariam A, *et al.* A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004 : the effect of combination of control methods. *Malar J* 2006 ; 5 : 33.
8. Dondorp A, Nosten F, Yi P, Das DB, Phyo AP, Tarning J, *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 455-67.
9. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 2619-20.
10. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14 : 716-9.
11. WHO. Resistance of malaria parasites to drugs. World Health Organization, Geneva, 1965.
12. WHO. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials : Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1973 ; 529 : 1-121.
13. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J* 2009 ; 8 : 89.
14. Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, Duan J, Furuya T, *et al.* Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* 2003 ; 49 : 977-89.
15. Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop* 2005 ; 94 : 181-90.
16. Marfurt J, Müller I, Sie A, Oa O, Reeder JC, Smith TA, *et al.* The usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against *falciparum* malaria in Papua New Guinea. *Malar J* 2008 ; 7 : 61.
17. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJ, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, *et al.* Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51 : 991-7.
18. Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman A, *et al.* In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J Infect Dis* 2005 ; 191 : 1014-7.
19. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2000 ; 403 : 906-9.
20. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, *et al.* Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* 2004 ; 364 : 438-47.
21. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, *et al.* Pfmdr1 copy number and arteminisin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J* 2009 ; 8 : 11.
22. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, *et al.* Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum* : what next? *Trends Parasitol* 2001 ; 17 : 582-8.
23. Hyde JE. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* 2005 ; 94 : 191-206.

24. Ekala MT, Khim N, Legrand E, Randrianarivelojosia M, Jambou R, Fandeur T, *et al.* Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome b in multiple geographic sites. *Malar J* 2007 ; 6 : 164.
25. Musset L, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/ proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *J Antimicrob Chemother* 2006 ; 57 : 110-5.
26. Savini H, Bogreau H, Bertaux L, Bouchiba H, Kraemer P, Parzy D, *et al.* First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52 : 2283-4.
27. Bennett TN, Patel J, Ferdig MT, Roepe PD. *Plasmodium falciparum* Na+/H+ exchanger activity and quinine resistance. *Mol Biochem Parasitol* 2007 ; 153 : 48-58.
28. Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Deng B, Joy DA, Su XZ, *et al.* Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* 2004 ; 52 : 985-97.
29. Henry M, Briolant S, Zettor A, Pelleau S, Baragatti M, Baret E, *et al. Plasmodium falciparum* Na+/H+ exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 1926-30.
30. Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, *et al.* Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 7687-96.
31. Klokouzas A, Tiffert T, van Schalkwyk D, Wu CP, van Veen HW, Barrand MA, *et al. Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 321 : 197-201.
32. Henry M, Briolant S, Fontaine A, Mosnier J, Baret E, Amalvict R, *et al. in vitro* activity of ferroquine is independent of polymorphisms in transport protein genes implicated in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52 : 2755-9.
33. Ursing J, Zakeri S, Gil JP, Björkman A. Quinoline resistance associated polymorphisms in the pfcrt, pfmdr1 and pfmrp genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Trop* 2006 ; 97 : 352-6.
34. Parquet V, Briolant S, Torrentino-Madamet M, Henry M, Almeras L, Amalvict R, *et al.* Atorvastatin is a promising partner for antimalarial drugs in treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 2248-52.
35. Dahlström S, Veiga MI, Mårtensson A, Björkman A, Gil JP. Polymorphism in PfMRP1 (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1) amino acid 1466 associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 2553-6.
36. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, *et al.* Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005 ; 366 : 1960-3.
37. Briolant S, Almeras L, Fusai T, Rogier C, Pradines B. Cyclines et paludisme. *Med Trop* 2007 ; 67 : 86-96.
38. Briolant S, Baragatti M, Parola P, Simon F, Tall A, Sokhna C, *et al.* A Multinormal *in vitro* distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 688-95.
39. Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with pftetQ sequence polymorphism and copy numbers of pftetQ and pfmdt. *J Infect Dis* 2009 ; sous presse.
40. Briolant S, Fusai T, Rogier C, Pradines B. Tetracyclines antibiotics in Malaria. *Open Trop Med J* 2008 ; 1 : 31-46.
41. Djimdé AA, Dolo A, Ouattara A, Diakité S, Plowe CV, Doumbo OK. Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *J Infect Dis* 2004 ; 190 : 853-5.
42. Djimdé A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet* 2001 ; 358 : 890-1.
43. Plowe CV, Roper C, Barnwell JW, Happi CT, Joshi HH, Mbacham W, *et al.* World Antimalarial Resistance Network (WARN) III : molecular markers for drug resistant malaria. *Malar J* 2007 ; 6 : 121.
44. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, *et al.* A molecular marker for chloroquine-resistant malaria. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 257-63.
45. Sibley CH, Barnes KI, Watkins WM, Plowe CV. A network to monitor antimalarial drug resistance : a plan for moving forward. *Trends Parasitol* 2008 ; 24 : 43-8.

Kaléïdoscope impovisé dans un temple, Birmanie © Ethevenin T.