

## Résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques : impact sur la pré-élimination du paludisme à Madagascar

Andriantsoanirina V<sup>1,4</sup>, Ménard D<sup>1</sup>, Tuséo L<sup>2</sup>, Ratsimbaoa A<sup>3</sup>, Durand R<sup>4</sup>

1. Unité de Recherche sur le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1246, Antananarivo, Madagascar

2. Bureau de l'Organisation Mondiale de la Santé à Madagascar et à la Réunion, Antananarivo, Madagascar

3. Département de Santé Publique, Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo, Madagascar

4. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

*Med Trop* 2011 ; 71 : 298-304

**RÉSUMÉ** • Cette revue a pour objectif de faire le point sur la résistance actuelle de *P. falciparum* aux principaux antipaludiques utilisés à Madagascar et d'apporter des données récentes pouvant être utiles à la mise en œuvre du programme de contrôle et de l'élimination du paludisme. En 2006, le taux d'échec global à la chloroquine s'élevait à 44% (n=300), taux comparable à ceux observés sur le continent africain. Les échecs observés étaient majoritairement de type tardif. La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine à Madagascar apparaît particulière avec seulement 3,2% d'isolats ayant un phénotype résistant (n=372, 7 sites sentinelles) et moins de 1% d'isolats présentant des parasites mutants sur le gène *Pfcr*. Par contre la mutation *Pfmdr1* N86Y, a été trouvée chez 64,3% des isolats (n=174) en 2006 et chez 51,7% des isolats (n=343) en 2007. Les échecs thérapeutiques de l'association sulfadoxine-pyriméthamine, recommandée pour le traitement préventif intermittent des femmes enceintes, et la résistance *in vitro* à la pyriméthamine sont rares. Cependant, nous rapportons une fréquence importante de triples mutants *Pfdhfr* 511/59R/108N allant jusqu'à 33,3% en 2008. De plus, un haplotype unique à Madagascar, l'allèle simple mutant *Pfdhfr* 164L, a été trouvé en 2006 avec une fréquence allant jusqu'à 30% des isolats en certains sites en 2008 (Sud-Est). Pour l'instant nous n'avons pas trouvé de quadruples mutants *Pfdhfr* 511/59R/108N/164L. La sensibilité aux autres antipaludiques testés apparaît excellente mais la perte des isolats les plus sensibles *in vitro* aux dérivés de l'artémisinine, observée ces dernières années, pourrait annoncer le début d'une moindre efficacité de ces molécules.

**MOTS-CLÉS** • *Plasmodium falciparum*, antipaludiques, résistance, Madagascar

### RESISTANCE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* TO ANTIMALARIAL DRUGS: IMPACT ON MALARIA PRE-ELIMINATION IN MADAGASCAR

**ABSTRACT** • The purpose of this review was to provide up-to-date information on the resistance of *Plasmodium falciparum* to the main antimalarials used in Madagascar and to assist implementation of the malaria control and elimination program. In 2006, the failure rate for chloroquine treatment was 44% (n = 300) and was comparable to the rate observed in continental Africa. Most treatment failures occurred after the first week of follow-up. *P. falciparum* resistance to chloroquine appeared to be special in Madagascar with only 3.2% of isolates showing *in vitro* resistance (n = 372, 7 sentinel sites) and less than 1% harbouring mutant parasites within the *Pfcr* gene. Conversely, the *Pfmdr1* N86Y point mutation was found in 64.3% (n = 174) of isolates in 2006 and in 51.7% (n=343) in 2007. Failure of combined sulfadoxine-pyrimethamine therapy, i.e., the recommended intermittent preventive treatment for malaria during pregnancy, and *in vitro* resistance to pyrimethamine were rare. However, the *Pfdhfr* 511/59R/108N allele showed consistently high prevalence levels reaching 33.3% in 2008. Moreover, the single *Pfdhfr* 164L mutant allele, a haplotype unique to Madagascar, was discovered in 2006 and showed prevalence rates up to 30% in some locations (southeast) in 2008. Up to now, the quadruple mutant allele *Pfdhfr* 511/59R/108N/164L has not been observed. Susceptibility to the other antimalarials tested appeared excellent but the number of isolates showing *in vitro* susceptibility to artemisinin derivatives has been fallen in recent years and this decline may herald a decrease in the efficacy of these drugs.

**KEY WORDS** • *Plasmodium falciparum*. Antimalarial drug resistance. Madagascar.

Située au sud de l'équateur dans la partie occidentale de l'Océan Indien, cinquième île du monde (587 000 km<sup>2</sup>), Madagascar est séparée de l'Afrique par le canal de Mozambique. Les origines de la population malgache, mal connues, résultent d'un métissage important entre des migrants du monde arabe (12<sup>e</sup> siècle), d'Afrique, d'Inde, d'Asie et d'Europe (jusqu'au 15<sup>e</sup> siècle). Le paludisme, connu sous le nom de « tazomoka » en terme malgache (tazo = fièvre, frisson et moka = moustique), reste un des problèmes majeurs de santé publique. La quasi totalité de sa population, estimée à 20 millions d'habitants en 2009, est exposée au risque de paludisme (figure 1), pour moitié en zones endémiques (zones côtières) et pour l'autre moitié dans des régions à tendance épidémique (hautes terres centrales (HTC) et Sud subdésertique) (1). En

2009, 210 000 cas confirmés de paludisme (figure 2) dont 85 600 chez des enfants de moins de 5 ans ont été rapportés. La prévalence de *Plasmodium falciparum*, de *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* est estimée, respectivement, à 90%, 6,3%, 1,1% et moins de 1% (2, 3). Pour l'instant, *P. knowlesi* n'a pas été détecté à Madagascar (données non publiées). Quatre faciès épidémiologiques sont décrits selon la durée et l'intensité de la transmission : le faciès tropical, le faciès équatorial, le faciès des HTC et le faciès subdésertique (figure 1). *An. funestus*, *An. gambiae*, et *An. arabiensis*, assurent l'essentiel de la transmission.

Le paludisme a épargné les HTC jusqu'au milieu du 19<sup>e</sup> siècle puis des mouvements de populations (arrivée massive d'une main d'œuvre venue d'Afrique ou des côtes malgaches) et des changements de l'environnement (riziculture, construction de lignes ferroviaires, ...) ont multiplié les gîtes à *An. gambiae* et ont entraîné l'introduction de *P. falciparum* sur les HTC. Des épidémies meur-

• Correspondance : landyvalerie@gmail.com

• Article reçu le 17/05/2010, définitivement accepté le 25/01/2011

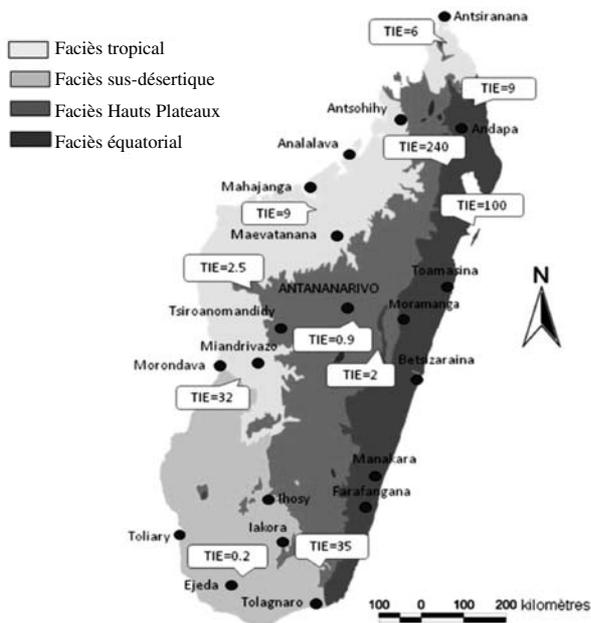


Figure 1. Carte présentant les sites de surveillance de la résistance de 2006-2008.

Faciès équatorial et tropical avec un paludisme stable et une transmission identique d'une année à une autre et pérenne ou étalée sur la majeure partie de l'année le long des côtes. La prémunition s'établit au niveau de la population. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus à risque. Faciès Hauts-Plateaux et sub-désertique avec un paludisme instable et une transmission, variant d'une année à une autre, faible et saisonnière sur les Hautes Terres Centrales (HTC) et dans le Sud sub-désertique. La population acquiert peu ou pas d'immunité. Toute la population est à risque et des poussées épidémiques peuvent se produire.  
TIE : taux d'inoculation entomologique

trières ont ainsi eu lieu en 1878 et 1895 (4). La quinine (QN) a été introduite à Madagascar par l'armée française au début du 20<sup>e</sup> siècle puis la chloroquine (CQ) vers le milieu des années 1940. Ces molécules côtoyaient les traitements « locaux » à base de plantes proposés par les tradipraticiens pour la prise en charge des cas de fièvre. A partir de 1949, la lutte contre le paludisme a été menée avec davantage d'organisation, visant même à l'éradication. Madagascar a fait partie des premiers pays concernés par la Campagne d'Aspersion Intra-Domiciliaire (CAID) de DDT en 1949. La CQ a été utilisée à partir de cette même année, notamment au cours du

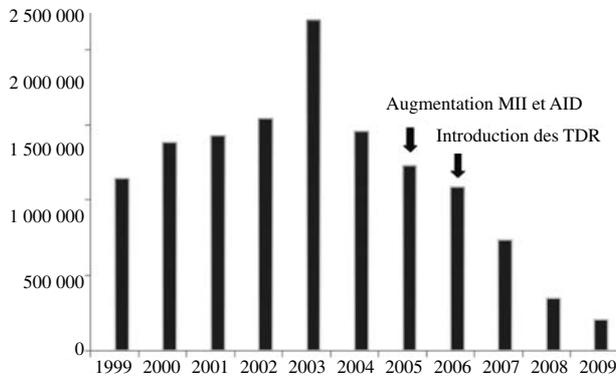


Figure 2. Nombre de cas rapportés (1999-2005) et confirmés (2006-2009) de paludisme à Madagascar.

2005-2006 : Augmentation du nombre de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) distribuées et de campagne d'aspersion intra-domiciliaire (AID).

programme de prophylaxie hebdomadaire gratuite des enfants de moins de 16 ans à la dose de 5 mg/kg. Au total plus de 1 250 000 enfants traités au sein de 10 500 centres et postes sanitaires entre 1949 et 1979 ont bénéficié de cette chimioprophylaxie généralisée par la CQ. Il s'en est suivi une réduction considérable des accès palustres, des accès graves et des décès. L'éradication progressive d'*An. funestus*, vecteur principal dans cette région, fut l'une des principales raisons de ce succès. En 1975, les pulvérisations de DDT ont été arrêtées. En 1979, la « nivaquinisation » des enfants n'a plus été assurée faute d'approvisionnement. Dès 1984, une augmentation de la morbidité palustre a été constatée. Une épidémie mortelle a frappé les HTC en 1987-88 entraînant de 40 000 à 100 000 décès (5). A partir de 1988-1989, la CQ était en vente libre à un prix subventionné non seulement dans les filières médicales classiques mais aussi au sein de structures parallèles gérées par des dispensateurs locaux (épiciers, instituteurs, volontaires...). La population s'auto-traitait à défaut d'être prise en charge dans les centres de santé. Les traitements insecticides par DDT étaient également reconduits et intensifiés entre 1993 et 1998 au sein des 27 districts par le programme d'opération de pulvérisation intra-domiciliaire (6). Depuis 1994, le service de lutte contre le paludisme du ministère de la santé a mis en place une structure de surveillance épidémiologique du paludisme et un système d'alerte sur les HTC. Madagascar a fait son adhésion au programme « Roll Back Malaria » en 2002.

En 2006, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a recommandé le remplacement de la CQ par une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (ACT) : l'association artésunate-amodiaquine (ASAQ) pour traiter en première intention les cas de paludisme non compliqué. Dans les faits, la CQ a été remplacée dans les structures sanitaires mais elle reste encore utilisée au niveau communautaire, où son remplacement par l'ASAQ commence à se mettre en place. L'association artémether-luméfantrine (AL) est recommandée en traitement de seconde intention. La QN reste utilisée en cas de forme grave. L'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est recommandée pour le traitement pré-symptomatique intermittent (TPI) chez les femmes enceintes (7).

Depuis 2007, Madagascar fait partie des 82 pays en phase de contrôle du paludisme et est engagée dans un programme d'élimination (8). La mise en œuvre de ce programme national vers l'élimination du paludisme (2007-2012) a pour objectif de réduire la mortalité et la morbidité liées au paludisme respectivement de 90 % et de 75 %, et de prendre en charge correctement tous les patients vus en consultation dans les formations sanitaires ou au niveau communautaire. Selon les faciès épidémiologiques une diversification des méthodes de lutte a été mise en place reposant pour l'essentiel sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) à effet durable, l'aspersion intra-domiciliaire d'insecticide, la prise en charge correcte et rapide de tous les cas de paludisme, et le TPI chez les femmes enceintes.

La résistance de *P. falciparum* aux divers antipaludiques constitue une menace majeure pour le contrôle de cette maladie. Les premiers cas de chloroquino-résistance (CQR) à Madagascar ont été détectés en 1975 soit pratiquement au même moment, voire même un peu avant, que les premiers cas en Afrique de l'Est. Depuis la confirmation des premiers cas en 1981, diverses études utilisant les méthodes d'évaluation de la résistance (efficacité thérapeutique, chimiosensibilité *in vitro* et marqueurs moléculaires), ont été menées dans plusieurs localités. Pendant longtemps, ces études ont rapporté une résistance de niveau modéré pour la CQ et faible pour les autres molécules. Cette revue a pour objectif de faire un point actuel sur la résistance de *P. falciparum* aux principaux antipaludiques utili-

sés à Madagascar et d'apporter des données récentes pouvant être utiles à la mise en œuvre du programme visant à éliminer le paludisme.

## Les antipaludiques et leur profil de résistance

### La chloroquine (CQ)

La CQ est utilisée à Madagascar depuis 1945. Plusieurs études ont montré une stabilité de la CQR à un niveau relativement faible au cours des années 1981-2005, n'excédant que rarement le seuil de 25 % de résistance clinique (9-11) et ce malgré une utilisation massive et non contrôlée en automédication (12). Lors d'une étude multicentrique en 2006, le taux d'échec global à la CQ s'élevait à 44 % (n=300) en moyenne (tableau 1), un taux comparable à ceux observés sur le continent africain. Les échecs observés étaient majoritairement de type tardif (13). Cette situation a milité pour le remplacement de la CQ par l'ASAQ en traitement de première intention de l'accès palustre non compliqué. De manière surprenante, les tests de chimiosensibilité *in vitro* effectués à cette même période ne montraient que 3,2 % d'isolats de phénotype résistant (n = 372, 7 sites sentinelles) avec une moyenne géométrique de  $CI_{50}$  relativement basse (18,5 nM) confirmant les résultats des études antérieures (12). De plus, les parasites mutants sur le gène *Pfcr*, principal responsable de la CQR, n'étaient présents que chez moins de 1 % des isolats. Par contre, la mutation *Pfmdr1* N86Y, associée à la résistance à la CQ (14) a été trouvée en 2005 chez 67,5 % des isolats collectés en 3 sites (15) et lors d'une étude multicentrique dans 64,3 % des isolats (n = 174) en 2006 et dans 51,7 % des isolats (n = 343) en 2007 (12).

La résistance de *P. falciparum* à la CQ à Madagascar apparaît donc particulière. Au vu de ces faits, nous avons étudié spécifiquement l'association entre les échecs thérapeutiques à la CQ et le polymorphisme du gène *Pfmdr1*. Une sélection de la mutation *Pfmdr1* N86Y entre J0 et le jour de l'échec a été observée. Une analyse multivariée a également montré que la présence de la mutation *Pfmdr1* N86Y constituait un facteur de risque d'échec thérapeutique (OR = 4,6 ; IC 95 % = 2,3 à 8,9, P < 0,0001) et que la médiane de survie des patients porteurs de parasites mutants *Pfmdr1* N86Y (n=163, médiane de survie estimée à 21 jours) était significativement plus courte que les patients porteurs de parasite sauvage (n=77, médiane de survie estimée à 28 jours) (16).

La résistance à la CQ semble différente de celle observée en Afrique sub-saharienne, en Asie ou en Amérique du Sud. Différents phénotypes de résistance de *P. falciparum* à la CQ sont prévalents dans ces continents (17). Des études récentes ont montré que les phénotypes de résistance à la CQ sont régis par différentes combinaisons d'haplotypes *Pfcr* et *Pfmdr1* qui interagissent entre elles selon des modalités qui restent à préciser. En particulier, le niveau de réponse à la CQ est affecté par différentes mutations de *Pfmdr1* dont l'effet dépend de l'haplotype particulier de *Pfcr* avec lequel elles sont associées (17). On sait également qu'un haplotype mutant de *Pfcr*, CVIET, originaire d'Asie a envahi l'Afrique d'Est en Ouest au cours des années 1970-1980 (18, 19). Madagascar a été relativement épargné par la CQR pendant de nombreuses années, comparativement à ce qui était observé en Asie ou en Afrique. L'allèle CVIET, quoique présent en forte proportion dans l'archipel des Comores, n'a pas diffusé sur la Grande Île (12). Ceci a permis d'objectiver l'effet de différents haplotypes mutants de *Pfmdr1*, associés à l'allèle sauvage de *Pfcr*, dans la résistance à la CQ, alors que cet effet a pu être masqué ailleurs dans le monde par la forte prévalence de mutants *Pfcr*. Ces combinaisons d'allèles *Pfcr* CVMNK (sensibles à la CQ) avec des

Tableau 1. Résumé des données collectées en 2006-2008 sur les antipaludiques utilisés à Madagascar

Molécule	Résistance thérapeutique (%)	Etude <i>in vitro</i>		Prévalence des allèles (%)			
		Moyenne géométrique $CI_{50}$ (nM)	Isolats résistants (%)				
AQa	1,7	8,3	0,5				
QN	-	53,7	0	<i>Pfnhe1</i>			
ACTs	DHA	0,95	0				
	ASAQ	1,8	-				
MF	-	6,7	0,4				
CQ	44	18,5	3,2	<i>Pfcr</i>	2006	2007	2008
				76T	0,7	-	-
				<i>Pfmdr1</i>			
				86Y	64,3	51,7	-
				184F	70	69,4	-
SP	3,3	-	-	1246Y	32,4	28,9	-
				<i>Pfdhfr b</i>			
				NCSL	1,0	5,5	8,8
				NCNI	2,1	0,8	1,1
				ICNI	0	0	1,1
				IRNI	27,7	34,1	33,3
				<i>Pfdhps</i>			
				SGKAA	35,8	46,2	-

Etude clinique faite en 2006 ; études *in vitro* et moléculaires faites en 2006-2008

a. Monodesethylamodiaquine (MDA) pour le test *in vitro*

b. Haplotype correspondant aux codons N511/C59R/S108N/I164L, les codons mutés sont représentés en gras et soulignés

c. Haplotype correspondant aux codons S436F/A437G/K540E/A581G/A613T, les codons mutés sont représentés en gras et italique

Le nombre de patients pour l'étude de l'efficacité thérapeutique à l'AQ, ASAQ, CQ et SP est respectivement de 356, 330, 300 et 361. Le nombre d'isolats pour les tests *in vitro* à l'AQ, QN, DHA, MF et CQ est respectivement de 373, 373, 370, 281 et 372.

haplotypes *Pfmdr1* mutants en une ou plusieurs positions (86, 184 et 1246) ont généré des échecs thérapeutiques en proportion élevée (44 %) chez une population souvent moins immune qu'en Afrique subsaharienne. De manière intéressante, ces échecs apparaissaient généralement sous forme d'échecs tardifs. De plus, cette CQR ne se traduisait pas *in vitro* par des  $CI_{50}$  notablement plus élevées, le test de chimiosensibilité *in vitro* n'étant peut-être pas adapté pour mettre en évidence ce type de CQR. Les modifications alléliques de *Pfmdr1* ont été associées à des effets sur la réponse à la CQ et à l'AQ mais aussi à d'autres molécules antipaludiques telles que la QN, la MF, l'halofantrine et l'artémisinine. Il faudra voir à l'avenir dans quelle mesure la proportion élevée de mutants *Pfmdr1* observée à Madagascar peut avoir un impact sur la résistance à ces autres antipaludiques, même si pour l'instant cet impact semble modeste.

### L'amodiaquine (AQ)

L'AQ, une amino-4 quinoléine utilisée sans interruption à Madagascar depuis les années 1950, a montré une meilleure activité que la CQ (11). En 2006, nous avons observé 1,7 % (n=356) d'échecs thérapeutiques. L'évaluation *in vitro* de la sensibilité à la monodéséthylamodiaquine (MDA), le métabolite actif de l'AQ, n'a montré aucun cas de résistance (12). Ces données justifient pleinement son emploi en association avec l'artésunate en première intention dans le traitement de l'accès palustre non compliqué.

### La Méfloquine (MF)

La MF n'est pas couramment utilisée à Madagascar à cause de son coût élevé. Toutefois, les résultats des études *in vivo* (13) et *in vitro* (12, 15, 20) ont montré sa très bonne efficacité. L'augmentation du nombre de copie du gène *Pfmdr1*, associée à la résistance *in vivo* et *in vitro* à la MF (21, 22) n'a pas été mise en évidence sur les isolats malgaches (12).

### La quinine (QN)

Théoriquement réservée pour le traitement des formes graves ou lors d'un échec aux autres antipaludiques, la QN est en fait, d'après une enquête menée en 2006, le premier antipaludique prescrit par les praticiens (12). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude récente de l'efficacité clinique de la QN à Madagascar. Cependant, la chimiosensibilité *in vitro* à la QN apparaît excellente dans toutes les études (11, 12). Des polymorphismes du gène *Pfnhe-1* ont été rapportés comme associés à la diminution de sensibilité à la QN dans plusieurs études récentes (23-25). Une autre étude en Inde n'a pas trouvé cette association (26). Nous n'avons pas non plus mis en évidence d'association entre ces polymorphismes et la sensibilité *in vitro* à la QN sur nos isolats malgaches. (27). La diminution de sensibilité à la QN associée à *Pfnhe-1* pourrait être souche-dépendante, la résistance à la QN étant un phénomène complexe requérant probablement la contribution de plusieurs transporteurs (28). Ces résultats contrastés trouvés par différentes équipes rappellent les discussions passées au sujet de l'association de la mutation de *Pfmdr1* N86Y avec la résistance à la CQ, association qui fluctuait selon les études (14).

### La sulfadoxine-pyriméthamine (SP)

Recommandée en traitement de seconde intention pour les cas simples de 1997 à 2006, la SP était déjà utilisée bien avant cette

période à Madagascar. Elle est actuellement recommandée pour le TPI chez les femmes enceintes. L'échec thérapeutique à la SP et la résistance *in vitro* à la pyriméthamine sont rares (11). Nous avons confirmé l'efficacité de la SP par une étude multicentrique effectuée en 2006 (13). La proportion d'échecs thérapeutiques à la SP était faible (<5 %), justifiant pleinement son emploi dans le TPI chez les femmes enceintes.

Antérieurement à nos travaux, la prévalence d'isolats présentant des mutations dans les gènes *Pfdhfr* et *Pfdhps*, respectivement associés à la résistance à la pyriméthamine et à la sulfadoxine, était rapportée comme nulle (11, 29). Nous rapportons aujourd'hui une fréquence importante de mutants *Pfdhfr* en particulier celle du triple mutant *Pfdhfr* 511/59R/108N dont la prévalence est très hétérogène : proportion élevée dans l'Ouest du pays (>85 % à Tsiroanomandidy ; 67,7 % en 2008 dans le Nord-Ouest (Maevatanana, Mahajanga, Antsohihy et Analalava)), faible voire absente dans le Nord-Est (0 % à Andapa). L'étude de marqueurs microsatellites flanquant ce gène, a montré que la majorité des parasites avait pour origine l'Asie du Sud-Est et qu'une moindre proportion présentait un profil d'émergence locale. Nous avons également mis en évidence une fréquence importante de la mutation *Pfdhps* 437G (jusqu'à 30 %). De plus, un haplotype unique à Madagascar, l'allèle simple mutant *Pfdhfr* 164L, a été trouvé dans le sud du pays dès 2006, avec une fréquence atteignant 30 % en certains sites en 2008 (30). L'analyse des marqueurs microsatellites a montré que les isolats portant cette mutation étaient répartis en 14 haplotypes différents, confirmant un phénomène d'émergences locales (12). La mutation I164L associée à d'autres mutations sur *Pfdhfr* est fréquemment trouvée en Asie du Sud-Est, en Amérique latine et, pour l'instant, beaucoup plus rarement en Afrique (31). Jusqu'ici, seuls 4 haplotypes contenant la mutation 164L ont été décrits : le quadruple mutant *Pfdhfr* 511/59R/108N/164L (identique à celui trouvé aux Comores, rapporté par Maïga *et al.* (32) et Andriantsoanirina *et al.* (12)), les triple mutants 511/108N/164L (33) et 59R/108N/164L (34), et donc le simple mutant 164L (30). Lozovsky *et al.* ont étudié le niveau de sensibilité de différents haplotypes mutants de la DHFR plasmidiale dans un système de complémentation bactérienne (35). Dans ce système, les bactéries contenant l'allèle simple mutant 164L, ont montré un niveau de sensibilité *in vitro* à la pyriméthamine équivalent aux bactéries contenant l'allèle sauvage. Les premiers résultats de la détermination du phénotype 164L sur des isolats de *P. falciparum* semblent confirmer ces données (article en préparation). Pour l'instant nous n'avons pas trouvé de quadruples mutants DHFR à Madagascar. Cependant, l'importation du quadruple mutant 108N/511/59R/164L, présent aux Comores en très faible proportion (12), ne peut être exclue. Par ailleurs, la génération de ce quadruple mutant 511/59R/108N/164L sur un fond triple mutant 511/59R/108N, ayant les mêmes capacités de résistance vis-à-vis de la SP que les parasites analogues du Sud-Est asiatique ou d'Amérique latine, pourrait survenir. Lozovsky *et al.* soulignent que les quadruples mutants DHFR sont apparus et ont pu se maintenir en zone de faible transmission palustre telle l'Asie (35). L'émergence et la diffusion d'un tel quadruple mutant DHFR auraient des conséquences épidémiologiques importantes. En effet, le TPI, reposant sur l'administration de 2 doses supervisées de SP au cours de la grossesse, constitue un des éléments clés de la politique nationale de lutte contre le paludisme. Il y aurait également un risque de diffusion de ces parasites aux îles proches de l'Océan Indien voire même au continent Africain.

## Les dérivés de l'artémisinine

L'artésunate associé à l'AQ (ASAQ), récemment utilisé à Madagascar en première intention pour le traitement des accès simples, a montré une efficacité clinique excellente (13). Le suivi de la chimiosensibilité *in vitro* à la dihydroartémisinine des isolats de 2006 à 2008 ne montre pas d'isolats de sensibilité diminuée mais seulement une légère augmentation de la moyenne géométrique de la  $CI_{50}$  liée à la disparition des parasites les plus sensibles (12). Cette perte des isolats les plus sensibles observée *in vitro* peut néanmoins annoncer le début d'une moindre efficacité de ces molécules.

La résistance aux dérivés de l'artémisinine, récemment décrite en Asie, se traduit par une augmentation du temps de clairance parasitaire constituant un bon indicateur de la présence de parasites à faible sensibilité aux ACT (36), et non par une augmentation du temps de clairance de la fièvre. La sensibilité *in vitro* des isolats a été rapportée comme augmentée d'un facteur 10 dans 2 cas d'échecs de traitement par artésunate en monothérapie (37) mais ces données n'ont pas été confirmées dans l'étude de Dondorp *et al.* (36). Aucun polymorphisme dans le gène *PfSERCA* n'a été rapporté comme associé avec la résistance aux dérivés de l'artémisinine dans ces études récentes (36, 37).

## Proximité des Comores

La résistance de *P. falciparum* à Madagascar et aux Comores diffèrent beaucoup entre elles malgré la proximité des deux pays. Les régions du Nord-Ouest de Madagascar constituent la porte d'entrée et d'échange avec les Comores par le port et l'aéroport internationaux. La résistance aux antipaludiques aux Comores est mal connue. En 2001, une étude clinique a montré un taux d'échec clinique et parasitologique à la CQ allant de 50 à 88,5 %, constitué essentiellement d'échecs thérapeutiques précoces (38). La chimiosensibilité *in vitro* montrait une prévalence élevée de parasites résistant à la CQ (environ 43 %) (39). La prévalence de triple mutant *Pf dhfr* et de *Pf crt* 76T était de 45 % (12). Une étude réalisée en 2007 a montré des fréquences de résistance variant, selon les différentes îles de l'archipel, de 26,5 % à 68,4 % d'isolats triples mutants *Pf dhfr* 108N/51I/59R, et de 19,5 % à 94,5 % d'isolats mutant *Pf crt* 76T (40). Une étude à Marseille portant sur des voyageurs impaludés en provenance des Comores a montré 53 % d'isolats triples mutants *Pf dhfr* 108N/51I/59R et 56 % d'isolats mutant *Pf crt* 76T (39). Une étude portant sur des voyageurs en provenance des Comores entrant à Madagascar a montré 95 % d'isolats triples mutants *Pf dhfr* et 80 % d'isolats mutant *Pf crt* 76T (41). Les parasites résistant aux antipaludiques semblent donc avoir été introduits à Madagascar au moins en partie à partir des Comores (41). La très faible diffusion de parasites mutants *Pf crt* à Madagascar contraste avec celle des parasites mutants *Pf mdr1* pour lesquels la même prévalence a été trouvée à Madagascar et aux Comores. Seules les 3 mutations ponctuelles N86Y, Y184F et D1246Y ont été trouvées à Madagascar. Considérant les polymorphismes du gène *Pf mdr1*, nous avons observé qu'il n'y avait pas d'haplotype majoritaire, mais une hétérogénéité de distribution de 4 haplotypes, contrairement aux Comores où 66 % des parasites portaient l'haplotype mutant 86Y-184F-1246Y (12).

## Conclusion

La situation de Madagascar est particulière du fait de son insularité et de son niveau de résistance restant faible à modérée.

La résistance des souches aux antipaludiques peut constituer un obstacle majeur au contrôle et à l'élimination du paludisme. Elle peut en effet intervenir à 2 niveaux : traitements de première et seconde ligne de l'accès palustre par les ACTs, et TPI des femmes enceintes avec l'association SP. Pour l'instant, l'efficacité clinique de la SP et la sensibilité *in vitro* des souches à la pyriméthamine permettent de penser que la SP reste efficace à Madagascar. Cependant le taux non négligeable de parasites hébergeant des mutations sur le gène *Pf dhfr* nécessite une surveillance attentive de la sensibilité des souches dans le futur.

Les dérivés de l'artémisinine apportent une contribution importante dans le contrôle du paludisme (42). En Afrique, l'efficacité des antipaludiques à base d'artémisinine, ASAQ et AL, est très élevée (43). Les données actuelles semblent rassurantes et permettent d'envisager dans les années à venir une réduction considérable des accès palustres, des accès graves et des décès, au moins dans les régions des HTC. Mais le contrôle du paludisme à Madagascar est complexe du fait de la présence de divers faciès épidémiologiques. Les gains resteront sans doute partiels dans les régions de basse altitude où la transmission est continue. Il faudra vraisemblablement mettre en place à l'avenir une surveillance tenant compte de l'augmentation du temps de clairance parasitaire et non pas se limiter à des enquêtes cliniques classiques ou à la détermination de phénotypes qui se sont avérés non fiables pour la détection précoce de la résistance aux dérivés de l'artémisinine. Si les souches résistantes originaires du Cambodge venaient à diffuser à Madagascar, directement en provenance d'Asie ou après une étape en Afrique ou aux Comores, il est clair que le programme visant à contrôler, et à fortiori éliminer, le paludisme connaîtrait de graves difficultés.

Tout relâchement des programmes de contrôle pourrait être à l'origine d'une recrudescence de la transmission comme les échecs passés nous l'ont appris. Le gouvernement, les autorités respectives et les bailleurs de fonds doivent être fortement engagés dans cette lutte. Il nous apparaît nécessaire de renforcer la surveillance déjà mise en place par le Réseau d'Etudes de la Résistance (RER) et de créer un réseau de surveillance au niveau de l'Océan Indien. En particulier, la côte Ouest, constituant une porte d'entrée pour les parasites résistants venant des Comores, nécessite une surveillance attentive.

**Remerciements.** Nous remercions toutes les personnes impliquées dans les différentes études : les patients, leurs parents ou tuteurs, le personnel de santé des différents centres de santé impliqués dans le RER, le personnel de l'Institut Pasteur de Madagascar (Tianasoa Andriamandranoro, Herilalaina Andrianantenaina Martial Jahevitra, Stéphane Rabearimanana, Rogelin Raherinjafy, Emma Rakotomalala, Milijaona Randrianarivojosia, Tantely Randrianisoa, Marie Ange Rason, Leon Rabarijaona, Lucie Raharimalala, Fanjasoa Rakotomanana, Rindra Rendremanana, Arthur Randriamanantena, Laurence Randrianasolo, Odette Voahanginirina, Tiana Eugénie Rahasana, Jean François Carod, Jean-Michel Héraud, Joseph Andrianasy, Olivier Randriambololona, Alfred Rakotoarinelina, Désiré Rakotonivelo, Noéline Rasoarilalao, Zakaherizo Ramandrasoa, Hanitra Ranaivosoa, Didier Ralaizandry, Diamondra Raveloarisheno, Vony Rabekotonirina, Brunette Razanadrazanina, Léo Paul Andriamahazo, Mino Andrianjafy, Jean Bruno Velo Jasmin, Jean Yvon Niel Mahadimy, Mamisoa Judicaël Rakotonaivo, Jacquinet Mangolo, Zakaherizo Ramandrasoa Andriarajonantenaina, Jacques Randriamboavonjy, Patrick Rabemanantsoa, Marco Faniriko, Perlinot Herindrainy, Andriamandiby Petterson, Nohary Nina Harimanana Andrianina, Laza Fanazava), le personnel du Ministère de la Santé de Madagascar (Andry Rakotorahalahy, Paul Richard Ralainirina, Milasoa Mosa, Philémon Tafangy, Andrianirina Raveloson, Benjamin Rakotoson, Armand Eugène Randrianarivo-Solofoniaina), le personnel du Ministère de la Santé des Comores (Bedja Said Ahmed), ainsi que tous les collaborateurs nationaux ou internationaux (Michel Ratsimbason, Christiane Bouchier, Magali Tichit, Laurence Ma, Stéphane Picot, Céline Barnadas, Carol Hopkins Sibley, Odile Mercereau-Puijalon, Pascal Ringwald, Jacques LeBras). Les études ont été financées par la Direction des Affaires

Internationales du Réseau International des Instituts Pasteur, Plate forme Génomique de l'Institut Pasteur de Paris, l'Institut Pasteur de Madagascar, le Gouvernement Français (projet FSP/RAI 2001-168), le Fonds Mondial (Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria round 3 grant MDG-304-G05-M), La Banque Natixis, Impact Malaria (Observatoire de la Résistance aux Antipaludiques), l'Université Paris 13 (Service des Relations Européennes et Internationales) et l'Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée (IMEA) - Fondation Léon M'Ba.

## Références

- WHO. World health Organization. Madagascar Database. National Level Report. 2010.
- Barnadas C, Ratsimbaoa A, Ranaivosoa H, Ralaizandry D, Raveloarisheno D, Rabekotonorina V *et al.* Short report: prevalence and chloroquine sensitivity of *Plasmodium malariae* in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77 : 1039-42.
- Barnadas C, Ratsimbaoa A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S, *et al.* *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvmdr1* and *pvcr1-o* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 : 4233-40.
- Mouchet J, Laventure S, Blanchy S, Fioramonti R, Rakotonjanabelo A, Rabarison P, *et al.* La reconquête des Hautes terres de Madagascar par le paludisme. *Bull Soc Pathol Exot* 1997; 90 : 162-8.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. Biodiversité du paludisme dans le monde. Libbey J ed. Paris 2004; 428 p.
- Romi R, Razaarimanga MC, Raharimanga R, Rakotondraibe EM, Ranaivo LH, Pietra V, *et al.* Impact of the malaria control campaign (1993-1998) in the highlands of Madagascar: parasitological and entomological data. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66 : 2-6.
- Ministère de la Santé et du Planning Familial. Politique National de Lutte contre le Paludisme. 2005; 44 p.
- World Health Organization. WHO Global Malaria Program. Feb 2009.
- Willcox ML, Rakotondrazafy E, Andriamanalimanana R, Andrianasolo D, Rasoanaivo P. Decreasing clinical efficacy of chloroquine in Ankazobe, Central Highlands of Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98 : 311-4.
- Randrianarivojosia M, Raharimalala L, Randriamanantena A, Jambou R. Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* sur les régions cotières malgaches. *Med Trop* 2000; 60 : 243-9.
- Andriantsoanirina V, Ménard D, Tuseo L, Durand R. History and current status of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in Madagascar. *Scand J Infect Dis* 2010; 42 : 22-32.
- Andriantsoanirina V, Ratsimbaoa A, Bouchier C, Jahevitra M, Rabearimanana S, Radrianjafy R, *et al.* *Plasmodium falciparum* drug resistance in Madagascar: facing the spread of unusual *Pfddhr* and *pfmdr1* haplotypes and the decrease of dihydroartemisinin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 : 4588-97.
- Ménard D, Ratsimbaoa A, Randrianarivojosia M, Rabarijaona LP, Raharimalala L, Domarle O, *et al.* Assessment of the efficacy of antimalarial drugs recommended by the National Malaria Control Programme in Madagascar: up-dated baseline data from randomized and multi-site clinical trials. *Malar J* 2008; 7 : 55.
- 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.
- Rason MA, Andrianantenaina HB, Arieu F, Raveloson A, Domarle O, Randrianarivojosia M. Prevalent *Pfmdr1* N86Y mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar despite absence of *pfcr1* mutant strains. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76 : 1079-83.
- Andriantsoanirina V, Ratsimbaoa A, Bouchier C, Tichit M, Jahevitra M, Rabearimanana S, *et al.* Chloroquine clinical failures in *P. falciparum* malaria are associated with mutant *Pfmdr1*, not *Pfcr1* in Madagascar. *PLoS One* 2010; 5 : e13281.
- Sá JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, *et al.* Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106 : 18883-9.
- Arieu F, Fandeur T, Durand R, Randrianarivojosia M, Jambou R, Legrand E, *et al.* Invasion of Africa by a single *pfcr1* allele of South East Asian type. *Malar J* 2006; 5 : 34.
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, *et al.* Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; 418 : 320-3.
- Randrianarivojosia M, Harisoa JL, Rabarijaona LP, Raharimalala LA, Ranaivo L, Pietra V, *et al.* *in vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine compared with other major antimalarials in Madagascar. *Parassitologia* 2002; 44 : 141-7.
- 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.
- Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *Pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* 2006; 194 : 528-35.
- 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.
- Henry M, Briolant S, Zettor A, Pelleau S, Baragatti M, Baret E, *et al.* *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 transporter is involved in reduced susceptibility to quinine. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 : 1926-30.
- Vinayak S, Alam MT, Upadhyay M, Das MK, Dev V, Singh N, *et al.* Extensive genetic diversity in the *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 transporter protein implicated in quinine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51 : 4508-11.
- Choudhary V, Sharma YD. Extensive heterozygosity in flanking microsatellites of *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (*pfh1e-1*) gene among Indian isolates. *é2009*; 109 : 241-4.
- Andriantsoanirina V, Ménard D, Rabearimanana S, Hubert V, Bouchier C, Tichit M, *et al.* Association of microsatellite variations of *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (*Pfh1e-1*) gene with reduced *in vitro* susceptibility to quinine: lack of confirmation in clinical isolates from Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82 : 782-7.
- Nkrumah LJ, Riegelhaupt PM, Moura P, Johnson DJ, Patel J, Hayton K, *et al.* Probing the multifactorial basis of *Plasmodium falciparum* quinine resistance: evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger *Pfh1e*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 165 : 122-31.
- Randrianarivojosia M, Arieu F, Raharimalala LA, Parzy D, Rogier C, Jambou R. Current absence of pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum* in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 : 557-9.
- Ménard D, Andriantsoanirina V, Jahevitra M, Barnadas C, Tichit M, Bouchier C, *et al.* Dihydrofolate reductase I164L mutation in *Plasmodium falciparum*, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2008; 14 : 1166-7.
- Lynch C, Pearce R, Pota H, Cox J, Abeku TA, Rwakimari J, *et al.* Emergence of a dhfr mutation conferring high-level drug resistance in *Plasmodium falciparum* populations from southwest Uganda. *J Infect Dis* 2008; 197 : 1598-604.
- Maïga O, Djimdé AA, Hubert V, Renard E, Aubouy A, Kironde F, *et al.* A shared Asian origin of the triple-mutant dhfr allele in *Plasmodium falciparum* from sites across Africa. *J Infect Dis* 2007; 196 : 165-72.
- McCullum AM, Poe AC, Hamel M, Huber C, Zhou Z, Shi YP, *et al.* Antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: multiple origins and identification of novel dhfr alleles. *J Infect Dis* 2006; 194 : 189-97.
- Khim N, Bouchier C, Ekala MT, Incardona S, Lim P, Legrand E, *et al.* Countrywide survey shows very high prevalence of *Plasmodium falciparum* multilocus resistance genotypes in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 : 3147-52.
- Lozovsky ER, Chookajorn T, Brown KM, Imwong M, Shaw PJ, Kamchonwongpaisan S, *et al.* Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106 : 12025-30.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009; 361 : 455-67.
- Noedl H, Se Y, Sriwichai S, Schaecker K, Teja-Isavadharm P, Smith B, *et al.* Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. *Clin Infect Dis* 2010; 51 : e82-9.
- Silai R, Moussa M, Abdalli Mari M, Astafieva-Djaza M, Hafidhou M, Oumadi A, *et al.* Surveillance de la chimiosensibilité dû à *Plasmodium falciparum* et changement de politique dans l'Union des Comores. *Bull Soc Pathol Exot* 2007; 100 : 6-9.
- Parola P, Pradines B, Simon F, Carlotti MP, Minodier P, Ranjeva MP, *et al.* Antimalarial drug susceptibility and point mutations associated with drug resistance in 248 *Plasmodium falciparum* isolates imported from Comoros to Marseille, France in 2004-2006. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77 : 431-7.

40. Rebaudet S, Bogreau H, Silaï R, Lepere JF, Bertaux L, Pradines B *et al.* Genetic structure of *Plasmodium falciparum* and elimination of malaria, Comoros archipelago. *Emerg Infect Dis* 2010; 16 : 1686-94.
41. Ménard D, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Ahmed BS, Jahevitra M, Andriantsoanirina V, Rasolofomanana JR, *et al.* Drug-resistant malaria parasites introduced into Madagascar from Comoros Islands. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 : 1759-62.
42. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Mårtensson A, Abbas AK, Khatib R, *et al.* Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med* 2007; 4 : e309.
43. Mårtensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, *et al.* Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin Infect Dis* 2005; 41 : 1079-86.



Sénégal © Michel Rémy