

CHIMIOSENSIBILITE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX  
ANTIPALUDIQUES AU NIGER

ADEHOSSI E.<sup>0</sup>, MALAM ABDOU B.<sup>0</sup>, PAROLA P.<sup>1</sup>, PARZY D.<sup>2</sup>



<sup>0</sup> Faculté des Sciences de la Santé de Niamey (Niger)

<sup>1</sup> Centre de Formation et de Recherche en Médecine et Santé Tropicale, Marseille (France)

<sup>2</sup> Institut de Médecine Tropicale du service de Santé des Armées, Marseille (France)

**RESUME**

Nous avons réalisé un test thérapeutique *in vivo* à la chloroquine, couplé à une étude *in vitro* de chimiosensibilité et à une étude des gènes de mutation associés à la résistance aux antipaludiques en Septembre et Octobre 2001 à Niamey au Niger. Au total, 244 enfants ont été inclus. Une réponse clinique adéquate du traitement par chloroquine a été observée chez 78,3% des enfants de 1-15 ans, 78,9% des enfants de 1-5 ans, 77,9% des enfants de 6-10 ans et 78% des enfants de 11-15 ans. L'échec thérapeutique a été constaté dans 13,1% des cas dont 9,4% d'échec thérapeutique précoce et 3,7% d'échec thérapeutique tardif. Au vu de ces résultats, le Programme National de Lutte contre le Paludisme a décidé de maintenir la chloroquine comme traitement de première intention du paludisme simple à *P. falciparum* à Niamey.

Concernant les tests *in vitro*, sur les 244 souches, 26 seulement ont pu être cultivées, par défaut du transporteur. Sur ces 26 souches, 15 étaient sensibles à la chloroquine par les tests *in vitro* isotopiques. Concernant la sensibilité aux autres antipaludiques, 4 étaient résistantes la pyriméthamine, 5 au cycloguanil, 3 à l'atovaquone. Les tests moléculaires ont été effectués sur les souches qui avaient pu être isolées en cultures. Nous présentons ainsi les résultats de la prévalence des mutations des gènes *pfcr*, *dhfr* et *dhps* et discutons ces résultats par rapport à ceux des tests classiques.

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, chimiosensibilité aux antipaludiques, Niamey

**Summary**

*In vivo* and genetic tests for *Plasmodium falciparum* were carried out in September and October 2001 among children in Niamey, in the Republic of Niger. Two hundred and forty-four children were included.

Around 78,3% of the patients were successfully treated. In the 1-5 year-olds group there were 78,9% and in the 6-10 year old age group there were 77,9% and in the last group (11-15 year old) 78%. Relapses were observed in 13,1%, early relapses in 9,4% and late relapses in 3,7%. Then the Malaria National Control Program

Among 244 strains, only 26 kept in culture. Fifteen had sensitivity to chloroquine, 4 shown resistance *in vitro* to pyrimethamine, 5 to cycloguanil, 3 to atovaquone. Molecular test were performed in these strains. The results of the prevalence of *pfcr*, *dhfr* and *dhps* was presented and discussed.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, antimalarial drug susceptibility, Niamey

**INTRODUCTION**

Le paludisme représente au Niger la principale cause de morbidité dans le pays et une des principales causes de mortalité, même si le recueil des données est surtout basé sur la déclaration des cas de paludisme présumé. Selon le Système National d'Information Sanitaire (SNIS) du Niger, l'incidence moyenne du paludisme serait de 944/10000 habitants/an. L'espèce plasmodiale largement prédominante est *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) avec plus de 95%, tandis que *P. malariae* et *P. ovale* sont plus rarement décrits [1]. Le paludisme sévit de façon endémique entre Juin et Octobre avec une recrudescence saisonnière 2 mois après le pic des pluies [2].

L'apparition et l'extension de la chloroquinorésistance de *P. falciparum* en Afrique depuis une vingtaine d'années représente un des problèmes majeurs dans la lutte antipaludique et la prise en charge des cas. Elle a été rapportée pour la première fois au Niger en 1991 [3]. Si la chloroquine reste le traitement de première ligne recommandé dans les accès palustres non compliqués au Niger, comme dans la plupart des pays d'Afrique de l'Ouest, les données récentes concernant la chloroquinorésistance de *P. falciparum* au Niger sont peu nombreuses et une seule étude clinique prospective a été publiée en 1999 [4]. Ces dernières années, à côté des tests *in vitro* classiques par la méthode isotopique de

Lebras et Deloron [5], des marqueurs moléculaires associés à la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques ont été proposés. Ces marqueurs concernent les antifoliniques, les antifoliques et la chloroquine. Nous avons proposé une étude associant un test de chloroquinosensibilité *in vivo* selon le modèle de l'OMS [6] et des tests de chimiosensibilité *in vitro*.

#### Objectifs

Notre objectif général est d'étudier la chimiosensibilité de *P. falciparum* en 2001 chez des enfants atteints de cas de paludisme non compliqué à Niamey.

Nos objectifs spécifiques sont :

Réaliser un test d'efficacité thérapeutique de la chloroquine par une étude *in vivo* selon le protocole standardisé de l'OMS [6].

Réaliser des tests *in vitro* classiques de chimiosensibilité.

Rechercher les gènes de mutation associés à la résistance aux antipaludiques sur les souches plasmodiales prélevées.

#### **MÉTHODOLOGIE**

##### *A- Site de l'étude*

L'étude a été menée à Niamey dans trois dispensaires des Forces Armées Nigériennes.

##### *B- Etude *in vivo**

L'étude *in vivo* prospective, a été conduite selon le protocole standardisé de l'OMS de 1996 [6] de 14 jours sauf pour l'âge que nous avons élargi de 1 à 15 ans. A l'arrivée, l'enfant a été reçu par l'infirmier major, puis référé au médecin responsable de l'étude sur chaque site en cas de fièvre.

#### Recrutement

Ont été recrutés dans cette étude tous les enfants fébriles de 1 à 15 ans consultant dans les trois dispensaires retenus. Ces enfants ont bénéficié d'un examen clinique et d'un frottis goutte épaisse systématique au doigt avec mesure de la densité parasitaire. La lecture de la goutte épaisse a porté sur 100 champs.

#### Critères d'inclusion [6]:

Les critères d'inclusion sont :

- température axillaire supérieure ou égale à 37<sup>o</sup> C,
- infection mono spécifique à *P. falciparum* avec plus de 1000 parasites asexués par micro litre de sang,
- absence de malnutrition sévère,
- absence de signes généraux de danger pour les enfants ou de signes de gravité ou de complication selon les critères de l'OMS,
- absence de pathologie fébrile intercurrente,

- accord parental après information,
- accès à la structure de soin en cas d'aggravation ou apparition de signes cliniques pendant la durée de l'étude,
- possibilité de venir aux rendez-vous fixés pour le suivi.

L'auto traitement préalable n'est pas un critère d'exclusion.

#### Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion sont :

- apparition en cours d'étude d'une maladie intercurrente interférant avec la classification du résultat thérapeutique,
- déplacement du patient hors du rayon de suivi actif,
- traitement non suivi jusqu'à la fin en raison d'un retrait de consentement,
- administration d'un traitement antipaludique par une tierce personne,
- détection au cours du suivi d'une infection palustre mixte.

#### Abandon

On définit comme abandon tout malade inclus puis perdu de vue sans qu'un des critères précédents d'exclusion ne soit apparu au cours de l'étude.

#### Conduite pratique

Tous les patients inclus ont bénéficié d'une fiche renfermant les renseignements médicaux et des renseignements signalétiques pour les contacter en cas de non-respect des rendez-vous.

Tous les patients inclus sont traités par chloroquine (comprimé à 100 mg ou chloroquine sirop). La chloroquine est administrée à la posologie de 25 mg/kg répartis sur 3 jours (J0 et J1 : 10 mg/kg, J2 : 5 mg/kg). Du paracétamol est également administré à J0, J1 et J2 à la posologie de 50 mg/kg/j en 3 prises.

Les patients sont revus à J3, J7 et J14. La température corporelle est enregistrée ainsi que la parasitémie après réalisation d'une goutte épaisse comme décrit précédemment. Le rapport entre la parasitémie à J3 et celle à J0 est calculé. En parallèle, un frottis est réalisé dans tous les cas.

En cas d'apparition de fièvre ou de signes nouveaux en dehors des rendez-vous ou d'aggravation pendant la période de suivi, les patients sont revus avec réalisation d'un frottis mince.

Les patients présentant un échec thérapeutique précoce ou tardif sans signe de gravité sont traités par pyriméthamine-sulfadoxine (Maloxine<sup>®</sup> ou Fansidar<sup>®</sup>) aux posologies usuelles adaptées au poids.

En cas d'apparition secondaire de signes de gravité, les patients sont hospitalisés et reçoivent un traitement intraveineux ou intra rectal par quinine [7].

#### Effectif nécessaire

L'effectif nécessaire a été calculé en fonction :

- du degré de précision souhaité
- de l'ampleur du phénomène étudié (estimation de la prévalence du phénomène à mesurer)
- du degré de la confiance désirée en considérant que l'effectif de la population est supérieur à 10000 habitants.
- des perdus de vue

$$*n = \frac{\epsilon^2 P Q}{l^2} + \text{perte}$$

Où :

- $\epsilon = 1,96$  est le degré de confiance de 95%
- $P = 17\%$  est la prévalence du phénomène
- $Q = (1 - P) = 83\%$
- $l = 5\%$  est la précision
- Perte est estimée à 5%

$$*n = \frac{(1,96)^2 (0,17) (0,83)}{(0,05)^2} = 217 + 5\% = 228$$

#### Analyse des résultats

Les résultats cliniques de l'étude sont classés en 3 catégories :

- Echec thérapeutique précoce (ETP) : sujets présentant un état fébrile et une parasitémie à J3, une aggravation entre J0 et J3 ou parasitémie à J3 supérieure d'au moins 25% à celle de J0.
- Echec thérapeutique tardif (ETT) : aggravation ou fièvre en présence d'une parasitémie entre J4 et J14.
- Réponse clinique adéquate (RCA) : absence de parasitémie à J14, quelle que soit la température, ou une apyrexie à J14 avec ou sans parasitémie.

#### C- Test de chimiosensibilité in vitro

Les tubes de sang ont été prélevés à J0 chez tous les enfants inclus au niveau de chaque site d'étude. Des prélèvements de 5 ml ont été faits par ponction veineuse au pli du coude sur des tubes ACD. Ces prélèvements ont été quotidiennement centralisés et conservés à + 4°C puis expédiés par courrier express à l'IMTSSA du Pharo par colis réfrigéré, 50X50 cm, qu'ils nous ont fourni. Les départs à Niamey n'ont été possibles que les lundi et jeudi. Les délais d'acheminement sont de 96 heures pour que les parasites soient viables à leur arrivée à Marseille et donc pour être cultivés.

#### 2. Tests génétiques

Les tests génétiques se déroulent en deux étapes : la réaction d'amplification génomique et le séquençage.

bles. Les transporteurs ont donné leur accord quant aux délais requis.

#### 1. Tests in vitro classiques

Le test de chimiosensibilité employé est le semimicrotest de Le Bras et Deloron [5]. La culture des parasites est effectuée en présence d'antimalariques à concentrations croissantes. L'activité antipaludique est appréciée en fin de test par mesure de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée, un précurseur des acides nucléiques. Les résultats sont exprimés en Concentration Inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) qui représente la dose, en nanomoles (nM) pour laquelle on observe une diminution de moitié de l'incorporation isotopique par rapport à celle obtenue dans les puits témoins (en l'absence d'antimalarique). Chaque test sera complété par un dosage des antimalariques dans le plasma afin d'objectiver un auto-traitement préalable. La résistance est définie à l'IMTSSA pour les seuils suivants :

- CI<sub>50</sub> > 100 nM pour la chloroquine
- CI<sub>50</sub> > 800 nM pour la quinine
- CI<sub>50</sub> > 500 nM pour le cycloguanil
- CI<sub>50</sub> > 2 000 nM pour la pyriméthamine
- CI<sub>50</sub> > 30 nM pour la méfloquine
- CI<sub>50</sub> > 6 nM pour l'halofantrine
- CI<sub>50</sub> > 10,5 nM pour l'artésunate
- CI<sub>50</sub> > 6 nM pour l'atovaquone

## 2. 1. Réaction d'amplification génomique

Après décongélation, 200 µl sont prélevés dans chaque tube et directement utilisés pour l'extraction d'ADN, en utilisant le kit QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Pour la réaction d'amplification génomique (PCR pour « Polymérase Chain Reaction »), nous avons utilisé :

- les amorces D1 (5'-TTCTCCTTTTATGATGGAACAAGT-3') et C1 (5'-ATATGTAGTTTA CTAAAAGTTTATAT-3') permettant d'amplifier la totalité du gène (955 paires de bases) codant pour la dihydrofolate reductase (DHFR) de *P. falciparum* [8] ;
- les amorces N218 (5'-ATAATAGCTGTAGGAAGCAATGT-3') et N185 (5'-TGATACCCGAATATAAGCATAATG-3') [9] permettant d'amplifier 725 paires de base du fragment du gène de la dihydroptéroate synthétase (DHPS).
- les amorces TCRP3 (5'-TGACGAGCGTTATAGAG-3') et TCR4m (5'-GTTCTTTTTCAGCAAAAATTG-3') ou TCR4w (5'-GTTCTTTTTCAGCAAAAATCT-3') permettant d'amplifier 366 paires de base du gène de la PfCRT qui est une protéine de transport de la membrane vacuolaire.

Pour un volume total de 50 µl, la solution pour PCR comprend 5 µl d'ADN, 0,5 µM de chaque amorce, 200 µM dNTP (4 déoxynucléotide triphosphates), 50 mM KCl, 2U de Taq DNA polymerase (Eurogentec, Belgique) dans 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.2. Après une dénaturation à 95°C pendant 5 mn, la réaction de PCR comprenait 30 cycles d'amplification (95°C pendant 5 mn, 55°C pendant 30 s, 72°C pendant 40 s) [8]. La présence de matériel amplifié est objectivée par migration par électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium et examen sous UV. La taille du fragment amplifié est estimée par rapport à un marqueur de poids moléculaire. Un témoin positif (ADN de *P. falciparum*, IMTSSA) et un témoin négatif (ADN extrait de sang humain non parasité) sont inclus dans chaque réaction de PCR.

## 2. 2. Séquençage

Le kit QIAamp Purification Kit (QIAGEN, Allemagne) est utilisé selon les recommandations du fabricant pour purifier les produits de PCR qui sont élués dans 50 µl d'eau stérile. Les réactions de séquence utilisent le kit DNA sequencing kit (dRhodamine terminator, ABI Prism, Applied Biosystems, Grande-Bretagne) selon les recommandations du fabricant. Les séquences sont déterminées par le séquenceur automatique ABI Prism 310 (Perkin Elmer, USA). Chaque séquence est examinée pour la recherche de mutations :

- pour la DHFR [8] au niveau des codons :
  - 51 : asparagine mutée isoleucine → Ile51
  - 59 : cystéine en mutée en arginine → Arg59
  - 108 : serine mutée en asparagine ou en thréonine → Asp108 ou Thr108
  - 164 : isoleucine mutée en leucine → Leu164.
- pour la DHPS [10] au niveau des codons :
  - 436 : serine mutée en alanine ou phenylalanine → Ala436 ou Phe436
  - 437 : alanine mutée en glycine → Gly437
  - 540 : lysine mutée en alanine → Ala540
  - 581 : alanine mutée en glycine → Gly581
  - 613 : alanine mutée en thréonine ou serine → Thr613 ou Ser613
- pour la PFCRT [11] au niveau du codon 76 : thréonine mutée en lysine → Lys76

### C- Collecte et analyse des données

Les renseignements sont collectés sur une fiche d'enquête et les résultats sont collectés sur Epi-info 6.04. La collecte des données d'interrogatoire et cliniques est effectuée par des médecins tandis que les résultats parasitologiques sont transcrits par les techniciens de laboratoire. Pour les tests de chimiosensibilité classique et les tests de résistance, les résultats sont recueillis au niveau du laboratoire de l'IMTSSA. L'efficacité thérapeutique est analysée sur Epi-info et le test utilisé est le khi carré de Student.

### D- Comité d'éthique

Notre étude a été soumise au Comité Nationale d'éthique siégeant Ministère de la Santé Publique et des Affaires Sociales. Son accord a été obtenu. Les parents de nos patients ont été informés sur les objectifs de l'étude et leur consentement éclairé a été obtenu.

## RESULTATS

Au cours de notre enquête 513 enfants ont été examinés. Dans notre série, 72 enfants avaient une parasitémie inférieure à 1000/ $\mu$ l et 197 avaient une parasitémie négative. Au total, 244 ont donc été inclus. Parmi eux, 90 ont entre 1 et 5 ans, 104 entre 6 et 10 ans et 50 entre 11 et 15 ans. De plus nous avons eu 3 cas d'exclusion : 1 pour retrait de consentement et 2 pour déplacement en dehors de la zone d'étude. Au cours de l'étude, nous avons enregistré 18 cas d'abandon (7,4%) avec dans la classe d'âge de 1-5 ans un taux de 4,4% (Tableau 1). Un auto-traitement préalable était noté dans 14,3%. Le plus souvent par des comprimés de chloroquine achetés sur le marché.

L'âge moyen de nos patients est de 7 ans avec un écart type de 3,93.

### A- Test *in vivo*

La réponse clinique adéquate globale est de 78,3%. Elle est de 78,9% de 1 à 5 ans, de

77,9% de 6 à 10 ans et de 78% de 11 à 15ans (Tableau 1).

Il existe une parasitémie résiduelle chez 35 soit 18,3% de nos patients dont 31 au troisième jour et une parasitémie récurrente chez 10 de nos patients soit 5,2%.

Au total 23 enfants (9,4%) ont présenté un échec thérapeutique précoce (ETP) se retrouve chez décomposé en 5 cas d'aggravation, 13 cas de fièvre et parasitémie positive à J3 et 5 cas de parasitémie à J3 supérieure à celle de J0 de 25%.

Un échec thérapeutique tardif (ETT) a été constaté chez 9 patients (3,7%) et est du à la persistance de la fièvre avec une parasitémie positive. Il n'y a eu aucun cas d'aggravation.

Tous les patients en échec thérapeutique ont été traités avec succès par les traitements de deuxième intention.

**Tableau N°1** : Efficacité d'un traitement par chloroquine du paludisme non compliqué à *P. falciparum* à Niamey en Septembre et Octobre 2001, selon le test d'efficacité thérapeutique de l'OMS [6].

	1 - 5 ans	6 - 10 ans	11- 15 ans	Total
<b>Inclus</b>	90	104	50	244
<b>Exclus</b>	0 (0 %)	1 (1 %)	2 (4 %)	3 (1,2 %)
<b>Abandons</b>	4 (4,4 %)	9 (8,6 %)	5 (10 %)	18 (7,4 %)
J3	2	8	4	14
J7	2	1	1	4
J14	0	0	0	0
<b>RCA</b> <sup>1</sup>	71 (78,9 %)	81 (77,9 %)	39 (78 %)	191(78,3 %)
. Parasitémie résiduelle	14 (20,3 %)	16 (20 %)	5 (11,9 %)	35 (18,3 %)
J3	13	14	4	31
J7	1	2	1	4
J14	0	0	0	0
. Parasitémie récurrente	3 (4,3%)	5 (6,2 %)	2 (4,8 %)	10 (5,2 %)
<b>ETP</b> <sup>2</sup>	10 (11,1%)	10 (9,6 %)	3 (6 %)	23 (9,4 %)
. Aggravation	0	4	1	5 (21,7 %)
. F+P <sup>3</sup>	7	5	1	13
. J3 > J0 <sup>4</sup>	3	1	1	5
<b>ETT</b> <sup>5</sup>	5 (5,5 %)	3 (2,9 %)	1 (2 %)	9 (3,7 %)
. Aggravation	0	0	0	0
. F+ P	5	3	1	9
<b>Total Echec</b>	15 (16,7 %)	13 (12,5 %)	4 (8 %)	32 (13,1 %)

- 1 réponse clinique adéquate
- 2 échec thérapeutique précoce
- 3 fièvre et parasitémie
- 4 densité parasitaire à J3 supérieure à J0 de plus de 25%
- 5 échec thérapeutique tardif

**B- Tests in vitro**

Sur les 251 prélèvements, la totalité a été envoyée à l'IMTSSA. Cependant, 213 sont arrivés hors délai et un envoi a été égaré, du fait d'un dysfonctionnement du transporteur : arrêt de plusieurs jours à Abidjan. Ainsi, parmi tous ses prélèvements, seules 26 souches de *P. falciparum* ont pu être cultivées à l'IMTSSA.

**B-1- Tests de chimiosensibilité in vitro à la chloroquine**

**B-1-1- Tests isotopiques**

Sur les 26 souches cultivées avec succès, nous avons retrouvé 11 cas (42,30%) de résistance *in vitro* à la chloroquine et 15 cas (57,70%) sensibles. Parmi les 11 résistants, 2 correspondaient à des échecs thérapeutiques (N° 9767 et N° 9769) et 9 à des réponses cliniques adéquates. Parmi les 15 cas sensibles *in vitro* 2 correspondaient à des échecs thérapeutiques (N° 9657 et N° 9771) et 13 à une réponse clinique adéquate (Tableau 2).

**B-1-2 Tests moléculaires**

Le choix a été fait d'effectuer les tests moléculaires sur les échantillons de sang pour les-

quels la culture des parasites avaient été un succès.

Sur les 26 prélèvements analysés, la mutation Thr76 du gène *pfcr* associée à la résistance à la chloroquine était retrouvée pour 5 isolats (19,23%). Tous ces isolats étaient résistants à la chloroquine *in vitro* selon la méthode isotopique.

Inversement, aucune mutation n'était retrouvée pour les souches classées sensibles par les tests isotopiques.

Dans 2 cas (1 souche sensible (N° 9771) et 1 résistante (N° 9829) *in vitro* selon la méthode isotopique), la mutation ne concernait qu'un seul allèle du gène (Tableau 2).

**Tableau N2 :** Tests de sensibilité *in vitro* (méthode isotopique) à la chloroquine de 26 souches de *Plasmodium falciparum* collectées à Niamey en 2001 et étude des mutations du gène *pfcr*.

Les Concentrations Inhibitrices 50 % (CI<sub>50</sub>) supérieures au seuil définissant la résistance *in vitro* de la chloroquine (100nM) sont en rouge. Les mutations de *pfcr* sont en caractères gras. Les numéros de code en bleu correspondent à des échecs cliniques de la chloroquine.

Abréviations : K : Lysine, C : Cystéine, T : Thréonine, S : Sérine, A : Alanine, I : Isoleucine, N : Asparagine, R : Arginine

N°	9638	9641	9643	9648	9654	<b>9657</b>	<b>9767</b>	<b>9769</b>	<b>9771</b>	9774	9776	9777	9780
Chloroquine	26,3	<b>151,3</b>	<b>169</b>	<b>248</b>	34,8	27,5	<b>422</b>	<b>122</b>	< 25	< 25	<b>335</b>	90	< 25
TCR 76	K	<b>T</b>	<b>T</b>	K	K	K	<b>T</b>	<b>T</b>	K/T	K	K	K	K

N°	9786	9787	9789	9819	9826	9829	9833	9843	9850	985 2	9857	9879	9881
Chloroquine	< 25	36	<b>212</b>	<b>288</b>	<b>433</b>	<b>157</b>	<b>277</b>	< 25	< 25	33	28	< 25	< 25
TCR 76	K	K	K	K	K	K/T	<b>T</b>	K	K	K	K	K	K

**B-2- Tests de chimiosensibilité aux antifoliniques : cycloguanil et pyriméthamine**

**B-2-1- Tests isotopiques**

Pour la pyriméthamine, nous avons 4 souches (15,38%) résistantes *in vitro* et ces 4 souches étaient également résistantes au cycloguanil. Pour 6 isolats le seuil n'avait pas pu être déterminé et 16 isolats étaient sensibles.

Nous avons 1 cas de résistance au cycloguanil sans résistance à la pyriméthamine. Au total, nous avons donc 5 isolats (19,23%) résistants au cycloguanil, 6 isolats pour lesquels les seuils n'ont pas pu être déterminés et 16 isolats sensibles (Tableau 3).

**B-2-2- Tests moléculaires**

Au total, 2 isolats (N°9641 et N°9881) avaient la triple mutation Ile51 + Arg59 + Asp108, 2 isolats (N° 9767 et N° 9787) ont la double mutation Arg59 + Asp 108 et 1 seul la mutation Asp108. Aucun des isolats n'était porteur de la mutation Leu164.

Parmi les 4 parasites résistants *in vitro* aux 2 antifoliniques, 2 ne présentaient pas de mutation sur les gènes *dhfr* (N°9850 et N°9852), 1 présentait la triple mutation Ile51 + Arg59 + Asp108 (N°9641) et le dernier la double mutation Arg59 + Asp108 (N°9787) .

Le seul parasite résistant uniquement au cycloguanil présente la mutation Ser108Asp (Tableau 3).

Cependant, parmi les 16 parasites sensibles *in vitro*, 1 avait la triple mutation Ile51 + Arg59 + Asp108 (N°9881).

**Tableau N° 3 :** Tests de sensibilité *in vitro* (méthode isotopique) aux antifoliques (cycloguanil et pyriméthamine) de 26 souches de *Plasmodium falciparum* collectées à Niamey en 2001 et étude des mutations du gène codant pour la dihydrofolate reductase (DHFR).

Les Concentrations Inhibitrices 50 % (CI<sub>50</sub>) supérieures au seuil définissant la résistance *in vitro* du cycloguanil (2000 nM) et de la pyriméthamine (500nM) sont en rouge. Les mutations de *dhfr* sont en rouge.

Abréviations : K : Lysine, C : Cystéine, T : Thréonine, S : Sérine, A : Alanine, I : Isoleucine, N : Asparagine, R : Arginine

N°	963	9641	964	964	9654	965	976	9769	977	977	977	977	978
	8		3	8		7	7		1	4	6	7	0
Cycloguanil	< 10	<b>2848</b>	11,5	< 10	< 10	< 10	NI	<b>545</b>	< 10	< 10	NI	14,8	NI
Pyriméthamine	< 50	<b>8151</b>	< 50	< 50	309,6	< 50	NI	1945	< 50	< 50	NI	< 50	NI
DHFR	16	A	A	A	-	-	-	-	-	A	-	A	A
	51	N	<b>I</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	59	C	<b>R</b>	C	C	C	C	<b>R</b>	C	C	C	C	C
	108	S	<b>N</b>	S	S	S	S	<b>N</b>	<b>N</b>	S	S	S	S
	164	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

N°	9786	9787	9789	9819	9826	9829	9833	9843	9850	9852
Cycloguanil	< 10	<b>2822</b>	NI	NI	NI	< 10	12	< 10	<b>&gt;20.10<sup>3</sup></b>	<b>&gt;20.10<sup>3</sup></b>
Pyriméthamine	< 50	<b>7702</b>	NI	NI	NI	< 50	< 50	< 50	<b>40000</b>	<b>40000</b>
DHFR	16	-	-	A	A	A	A	A	A	A
	51	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	59	C	<b>R</b>	C	C	C	C	C	C	C
	108	S	<b>N</b>	S	S	S	S	S	S	S
	164	I	I	I	I	I	I	I	I	I

N°	9857	9879	9881
Cycloguanil	< 10	< 10	< 10
Pyriméthamine	< 50	< 50	< 50
DHFR	16	-	A
	51	N	<b>I</b>
	59	C	<b>R</b>
	108	S	<b>N</b>
	164	I	I

### B-3- Tests de chimiosensibilité *in vitro* aux antifoliques (sulfadoxine)

#### B-3-1- Tests isotopiques

Les tests *in vitro* isotopiques ne sont pas réalisés à l'IMTSSA pour les antifoliques comme la sulfadoxine, composante du Fansidar.

#### B-3-2- Tests moléculaires

Au total, 22 souches sur 26 présentaient des mutations du gène *dhps*. La mutation Gly437 est la plus fréquente et se voyait dans 13 cas. Treize souches étaient porteuses d'une seule mutation et 9 d'une double. De plus les 5 souches porteuses des mutations *dhfr* portaient les mutations *dhps* (Tableau 4).

#### B-4- Chimiosensibilité autres antipaludiques

Il n'existe pas de marqueurs moléculaires pour ces molécules à l'heure actuelle. Seuls des tests isotopiques ont été réalisés.

- Méfloquine

Sur les 26 prélèvements, nous n'avons pu déterminer le seuil de résistance dans 14 cas et dans 2 cas nous n'avons pu interpréter les résultats. Sur les 10 prélèvements restant aucun n'était résistant à la méfloquine.

- Artésunate

Pour 5 prélèvements, nous n'avons pu déterminer les seuils de résistance. Pour le reste, aucune des 21 souches testées n'était résistante à l'artésunate.

- Atovaquone

Pour l'atovaquone, le seuil de résistance n'avait pas pu être déterminé sur 18 souches et elle n'était pas interprétable dans 1 cas. Sur les 7 souches restantes, nous avons 3 résistances *in vitro* à l'atovaquone.

- Halofantrine

Pour l'halofantrine, le seuil de résistance n'a pas pu être déterminé sur 18 souches et les résultats ne sont pas interprétables dans 5

cas. Pour les cas restants, il n'y a pas de résistance *in vitro* à l'halofantrine.

**Tableau N°4 :** Etude des mutations du gène codant pour la de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) de 26 souches de *Plasmodium falciparum* collectées à Niamey en 2001.

Les mutations de *dhfr* sont en rouge. Abréviations : K : Lysine, C : Cystéine, T : Thréonine, S : Sérine, A : Alanine, I : Isoleucine, N : Asparagine, R : Arginine.

Les numéros de codes en bleu correspondent à des souches présentant également des mutations du gène *dhfr* (Tableau 3)

N°	9638	9641	9643	9648	9654	9657	9767	9769	9771	9774	9776	9777	9780
DHPS	436	A	A	A	A	A	A	S	F	A	S	F	A/S
	437	G	G	A	G	G	G	G	A	A	G	A	A
	540	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	581	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	613	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A	S	S

N°	9786	9787	9789	9819	9826	9829	9833	9843	9850	9852	9857	9879	9881
DHPS	436	S	F	A/S	S	S	-	A	F	A	S	A	S
	437	A	A	A/G	A	A	-	G	A	G	G	A	G
	540	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K/T	K
	581	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	613	S	A	A	A	A	A	A	S	A	A	A	A

## DISCUSSION

Au Niger, l'apparition de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a été décrite la première fois par Gay en 1991 [3] à propos de 5 patients traités à Paris pour un accès palustre au décours d'un voyage au Niger. Depuis une seule étude a été réalisée par Parola en 1998 [4]. Au cours de cette étude *in vivo* en période de haute transmission, basée sur le protocole de l'OMS 1996 et qui a porté sur 78 enfants de 1 à 15 ans et 53 adultes le taux d'échec thérapeutique était inférieur à 25%.

Dans cette étude, un échec thérapeutique avait été observé dans 20% des cas chez les enfants de 1 à 5 ans, dans 16,7% dans tout le groupe pédiatrique, et dans 5,7% chez les adultes. A cette époque et au vu des résultats, il avait été décidé de maintenir la chloroquine comme traitement de première intention du paludisme à *P. falciparum* non compliqué au Niger.

Notre étude est basée sur le protocole standardisé de l'OMS [6]. Ce protocole a été élaboré pour les zones de forte transmission palustre et la cible est représentée par des enfants de 1 à 5 ans, ce qui est particulièrement adapté pour les régions où la transmission du paludisme est intense et permanente et la prémunition acquise en général vers 5 ans [12]. Le faciès épidémiologique sahélien endémique

avec recrudescence saisonnière, comme à Niamey, est en général associé à une prémunition plus lente à s'établir [12, 7]. Ainsi dans cette étude sur la chloroquinosensibilité *in vivo* de *P. falciparum*, nous avons élargi notre recrutement aux enfants de 6 à 15 ans. Une étude identique a été faite au Mali, région de l'Afrique de l'Ouest ayant un climat comparable au notre [10] où ont été inclus des adultes dans deux régions différentes du pays. Dans notre étude, nous n'avons pas eu de différence significative entre les différents groupes d'âge pour la sensibilité à la chloroquine ( $p > 0,15$ ).

Nos résultats sont similaires à ceux du Mali [10].

Les résultats de notre étude *in vivo* avec 78,9% de réponse clinique adéquate chez les enfants de 1-5 ans et de 78,3% chez le total des enfants de 1-15 ans sont comparables à ceux de Parola en 1998 [3]. A partir de nos résultats, il a été décidé de maintenir la chloroquine comme traitement de première intention du paludisme à *P. falciparum* non compliqué au Niger. Cette étude *in vivo* a fait l'objet d'une publication [13].

Notre étude est la première au Niger associant un test d'efficacité thérapeutique selon le protocole standardisé de l'OMS [6] et des tests *in vitro* de chimiosensibilité, classiques et génétiques. Nous rapportons pour la première fois des données concernant l'épidémiologie moléculaire de la résistance de *P. falciparum* à la



chloroquine et aux antimétaboliques. Cependant, seules 10,65% des souches ont pu être cultivées. Ceci est essentiellement lié aux conditions de transport des souches qui ne peuvent conserver au-delà de 96 heures dans les tubes ACD. Il n'a pas été possible de faire une analyse statistique comparant les tests d'efficacité *in vivo* et les tests *in vitro*. Ainsi, nous rapportons des données préliminaires.

Concernant la chimiosensibilité *in vitro* à la chloroquine, parmi les 11 souches résistantes *in vitro*, 9 correspondaient à des réponses cliniques adéquates. Ceci pourrait être expliqué par une immunité qui retarderait la recrudescence. Ces 9 patients ont un âge compris entre 2 et 12 ans avec une moyenne de 6,25 ans. On ne peut pas exclure qu'une recrudescence puisse être constatée si le suivi avait été poursuivi au-delà de 14 jours. Récemment, l'OMS a proposé une mise à jour du protocole du test thérapeutique [14] et la durée de surveillance est passée de 14 à 28 jours dans les zones de basse et moyenne transmission dont le Niger fait partie.

Inversement, parmi les 15 souches sensibles *in vitro* à la chloroquine, 2 correspondaient à des échecs thérapeutiques cliniques. L'un de nos patients était en échec thérapeutique précoce avec une recrudescence de la parasitémie à J3 et le second en échec thérapeutique tardif avec persistance d'une parasitémie à J14. Il pourrait s'agir d'une aggravation naturelle de sa maladie ou d'une inefficacité du traitement secondaire à des vomissements bien que le traitement ait été donné à vue. Le dosage sérique de la chloroquine n'a pas pu être fait pour objectiver d'éventuels problèmes de pharmacocinétique.

Concernant la recherche des mutations de *pfcr*, nos données sont en accord avec la littérature [15]. En effet, parmi les souches sensibles *in vitro* à la chloroquine, aucune n'a la mutation Thr76 associée à la résistance à la chloroquine.

D'autre part, parmi les 11 souches résistantes *in vitro* à la chloroquine, 5 ont la mutation Thr76.

Cependant, il existe des succès thérapeutiques à la chloroquine chez des patients présentant la mutation Thr76. Ces données apparemment contradictoires sont également en accord avec celles de la littérature. En effet, plusieurs études ont confirmé que l'association de la mutation Thr76 reste essentielle à la résistance à la chloroquine, mais sa présence à un degré faible dans les souches chloroquinosensibles *in vivo* laisse penser que d'autres

atteintes du gène *pfcr* sont nécessaires ou que plusieurs gènes sont intéressés dans ce mécanisme de résistance [15]. L'absence de la mutation Thr76 est hautement prédictive de la réponse clinique au traitement par la chloroquine, alors que sa présence compte pour environ 33% des échecs thérapeutiques [11].

En définitive, d'autres études sont nécessaires pour déterminer des marqueurs moléculaires définitifs prédictifs de la résistance *in vitro* et *in vivo* à la chloroquine.

Les marqueurs moléculaires de résistance aux antifoliques ont été en revanche mieux déterminés ces dernières années. La mutation essentielle de la résistance de *P. falciparum* à la pyriméthamine est la mutation Asp108 du gène de la dihydrofolate réductase DHFR [15]. L'addition d'autres mutations telles que Ile51, Arg59 et Leu164 est associée à un haut degré de résistance à la pyriméthamine [8].

Dans notre étude, toutes les souches résistantes *in vitro* à la pyriméthamine présentent la mutation Asp108. L'association avec d'autres mutations se voyaient dans 2 cas pour (Ile51 + Arg59 + Asp108) et dans 2 cas pour Arg59 + Asp108. Aucune de nos souches n'avait la mutation Leu164. Ces résultats sont en accord avec les données d'études précédentes réalisées au Mali ou en Afrique de l'Est [15]. Ces mutations du codon 164, n'ont été à ce jour rapportées qu'en Asie du Sud-Est et en Amérique Centrale.

Cependant, parmi les 16 souches sensibles *in vitro* à la pyriméthamine, 1 présente la triple mutation (Ile51 + Arg59 + Asp108) associée à la résistance aux antifoliques. Nous n'avons pas pu trouver d'explication dans la littérature. Nous n'avons pas pu, du fait de contraintes de temps, contrôler à nouveau les résultats de cette souche en particulier.

Dans cette étude, nous retrouvons une prévalence modérée (5/26 ont au moins la mutation de base) des mutations de *dhfr* comme au Mali tandis qu'en Afrique de l'Est les mutations sont beaucoup plus fréquentes [16]. L'apparition des mutations (associées à la résistance *in vitro* de *P. falciparum* aux antifoliques) est directement liée à la pression médicamenteuse par l'utilisation de l'association pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar®). Très utilisée en Afrique de l'Est (traitement de première ligne au Malawi), cette association est actuellement recommandée comme traitement de 2<sup>e</sup> ligne au Niger où elle garde une excellente efficacité.

Nos résultats sont cependant limités par le faible nombre de souches qui ont pu être testées. D'autre part, la relation entre les mutations de *dhfr*, associées ou non à celle de *dhps*, avec l'échec clinique du Fansidar®, reste à préciser. Cependant l'absence de mutation de *dhfr*, semble associée à une efficacité clinique du Fansidar®, qu'il existe ou non des mutations de *dhps* [15].

Pour les autres molécules antipaludiques, en dehors de l'atovaquone, il n'y a pas de résistance *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec les données actuelles et donc le niveau de résistance est peu élevé au Niger, même si le faible nombre des souches qui ont pu être testées ne permet pas de tirer des conclusions définitives.

## CONCLUSION

Dans notre étude *in vivo*, l'étude menée selon le protocole standardisé de l'OMS 1996, montre un niveau modéré de résistance *in vivo* à la chloroquine. Au vu de ces résultats, le Programme National de Lutte contre le Paludisme a décidé de maintenir la chloroquine comme traitement de première intention du paludisme simple à *P. falciparum* à Niamey.

Notre étude *in vitro* est la première effectuée au Niger. Nous avons été confrontés à des contraintes techniques essentiellement liées au transport des souches. Nous avons pu tester seulement une partie des prélèvements à l'unité de parasitologie de l'IMTSSA. De ce fait sur le faible nombre d'échantillon analysé, nous n'avons pas pu mener tirer des conclusions statistiquement significatives.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Julvez J, Mouchet J, Michault A, Fouta A, Hamidine M. Eco-épidémiologie du paludisme à Niamey et dans la vallée du fleuve, République du Niger, 1992-1995. Bull Soc Pathol Exot. 1997;90(2):94-100.
- 2- Rattard RC, Manguin-gagarine S, Kaba MW. Plan de renforcement de la capacité d'étude et de contrôle du paludisme, partie II. VBC/USAID n°85259 A, 1991. 130p.
- 3- Gay F, Diquet B, Katlama C, Fassin D, Turk P, Detry A et al. Report of chloroquine resistance malaria in Niger. Therapie. 1991;46(1):90-1.
- 4- Parola P, Ali I, Djermakoye F, Crassard N, Bendavid C, Faugère B et al. Chloroquinosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la Clinique Gamkalley et à la PMI des Forces Armées Nigériennes (Niamey, Niger). Bull Soc Path Exo. 1999;92:317-9.
- 5- Le Bras J, Ringwald P. Chimiorésistance de *P. falciparum*. La situation en Afrique en 1989. Méd Trop. 1990;50(1): 11-6.
- 6- OMS. Evaluation de l'efficacité thérapeutique pour le traitement de *Plasmodium falciparum* non compliqué dans les régions à transmission élevée. 1996, WHO/MAL/96.1077;33p.
- 7- Barennes H, Mahaman Sani A, Kahia Tani F, Meda H, Khenine A. Tolérance de la quinine administrée en solution intrarectale chez l'enfant en Afrique francophone. Méd Trop. 1999;59(4):383-8.
- 8- Parzy D, Doerig C, Pradines B, Rico A, Fusai T, Doury JC. Proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* African isolates: assessment by mutation-specific polymerase chain reaction and *in vitro* susceptibility testing. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(6):646-50.
- 9- Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthétase and an additional factor associated with folate utilisation. Molec Microbiol. 1997;23:979-86.
- 10- Plowe CV, Doumbo OK, Djimde A, Kayentao K, Diourte Y, Doumbo et al. Chloroquine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali : parasitologic resistance versus therapeutic efficacy. Am J Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;64 (5-6):242-6.
- 11- Djimde A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant falciparum malaria. Lancet. 2001 Sep 15;358(9285):890-1.
- 12- Mouchet J, Carneval P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary et al. Typologie du paludisme en Afrique. Cah Santé. 1993;3:220-238.
- 13- Dugelay F, Adehossi E, Adamou S, Ousmane I, Parzy D, Delmont J, Parola P. Efficacy of chloroquine in the treatment of uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria in Niamey, Niger, in 2001. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Jan;97(1):83-6.
- 14- OMS. Monitoring Antimalarial Drug Resistance. 2002, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17;33p.
- 15- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. Lancet Infect Dis. 2002;2:209-18.
- 16- Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. J Infect Dis. 1997;176(6):1590-6.