

Réseau de surveillance moléculaire de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la pyriméthamine dans la vallée du fleuve Niger, au Niger.

M.L. Ibrahim (1), H. Hassane (1), L. Konate (2), S. Adamou (3), I. Ousmane (3), E. Adehossi (4), I. Jeanne (1) & J.-B. Duchemin (1)

(1) Centre de recherche médicale et sanitaire (CERMES), BP 10887 Niamey, Niger. E-mail : lamine@cermes.org

(2) Département de biologie animale, Faculté des sciences et techniques, Université Cheikh-Anta-Diop, BP 5005 Dakar, Sénégal.

(3) Programme national de lutte contre le paludisme, Ministère de la santé publique. BP 11402 Niamey, Niger.

(4) Département de médecine interne B3, Hôpital national de Niamey, BP238, Niamey, Niger.

Manuscrit n° 3049. "Santé publique". Reçu le 21 décembre 2006. Accepté le 13 février 2007.

Summary: *Plasmodium falciparum* chloroquine and pyrimethamine resistance monitoring network with molecular tools in the Niger river valley, Republic of Niger.

Plasmodium falciparum resistance to chloroquine first arose in Africa 25 years ago. Nowadays most of African malaria control programmes have switched their first-line treatment of uncomplicated malaria cases towards artemisinin derivatives combination. After WHO guidelines, a survey network for malaria treatment resistance has been set up in the Niger valley around Niamey since December 2004. The association of the Niger national malaria control programme with the CERMES research center allowed collecting of samples from both health centers and hospitals of this region. Blood finger-pricks on filter papers were tested for detection of plasmodial antigen in health center without biological diagnosis capacity. Specimens found positive either in hospital laboratory or by using antigen method were tested by PCR/RFLP to detect K76T mutations on the pfcr1 gene and S108N mutation on the pfdhfr gene. This simple procedure allows the screening of a large number of specimens. Moreover, a spatial distribution of mutations and evidence of resistance clusters were searched integrating the data in a geographic information system. The 76T mutation of pfcr1 and 108N of pfdhfr were respectively found in 50.8% and 57% of the specimens tested. No statistically significant difference was found according to the level of sanitary formations or the age of the patients. No resistance cluster was identified and the prevalence of mutation seems homogeneous in the zone. By completing the clinical efficacy studies we think that our simple method for collecting and testing blood samples associated with clinical efficacy studies may be useful for building a network of malaria drug resistance in Africa.

Résumé :

Après l'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine en Afrique, la plupart des programmes nationaux de lutte contre le paludisme ont changé leur traitement de première ligne du paludisme non compliqué. Comme recommandé par l'OMS, un réseau de surveillance de la résistance aux antipaludiques (RSRA) a été mis en place au Niger, dans la vallée du fleuve Niger, à partir de décembre 2004. Il repose sur la collecte active d'échantillons sanguins sur papier buvard. Leur analyse permet la confirmation biologique de paludisme, quel que soit le niveau de la formation sanitaire, en associant la recherche d'antigène plasmodial à celle de mutations des gènes pfcr1 et pfdhfr par PCR-RFLP. Cette méthode simple permet le criblage d'un nombre important d'échantillons et leur intégration dans un système d'informations géographiques pour l'analyse spatiale des mutations. La mutation K76T du gène pfcr1 et la mutation S108N du gène pfdhfr ont été retrouvées respectivement chez 50,8 % et 57 % des échantillons testés. Aucun foyer de plus forte résistance n'a été retrouvé dans la zone étudiée, ni aucune différence significative, selon le niveau des formations sanitaires. Sans pouvoir remplacer les tests d'efficacité clinique, la méthodologie proposée de collecte et de traitement des échantillons représente un avenir réel pour la mise en place de réseaux de surveillance et de suivi de la chimiorésistance en Afrique.

**Plasmodium falciparum
resistance
monitoring
network
map
Niger
Sub Saharan Africa**

**Plasmodium falciparum
chimiorésistance
surveillance
réseau
cartographie
Niger
Afrique intertropicale**

Introduction

De nombreux pays d'Afrique ont modifié leur schéma thérapeutique de l'accès palustre, suite à la mise en évidence de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. Ainsi, depuis décembre 2005, le Niger a introduit les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) en traitement de première intention du paludisme non compliqué et l'association sulfadoxine-pyriméthamine en traitement préventif intermittent chez la femme enceinte. Les tests d'efficacité clinique de la chloroquine réalisés à Niamey montraient, chez les enfants de 1 à 5 ans, un taux d'échec thérapeutique de 20,9 % en 1998 (6) et de 17,4 % en 2001 (3). Ces résultats publiés sont limités à Niamey. Plusieurs sites sentinelles ont été mis en place par le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) et font ou feront l'objet d'études *in vivo*. Parallèlement aux études *in vivo*, les tests moléculaires de résistance sont reconnus pour offrir une possibilité élargie de surveillance au sein de systèmes de suivi temporels ou spatiaux. Plusieurs marqueurs moléculaires ont pu être reliés à la résistance *in vivo* de *Plasmodium falciparum* à certaines molécules. La mutation K76T du gène *pfcr* confère une résistance à la chloroquine (1). Ce marqueur est bien corrélé à la clinique en Afrique, au moins dans les zones où la sensibilité des souches reste encore non négligeable. La mutation S108N du gène *pfdbhfr* est corrélée avec les tests *in vitro* de résistance du parasite à la pyriméthamine et la présence d'autres mutations aux codons 51, 59 et 164 renforce le niveau de cette résistance (5).

Ces marqueurs moléculaires, jusqu'à présent peu étudiés au Niger, montraient, en 2003, chez des enfants hospitalisés à Niamey, 45,7 % de souches présentant la mutation *pfcr*76T et 60,2 % avec *pfdbhfr*108N (4), tandis qu'un sous-échantillon des souches recueillies lors de l'étude *in vivo* à Niamey en 2001 montrait 26,9 % de mutations K76T ($n = 26$) et 20 % de mutation S108N ($n = 25$) (ADEHOSSI, données personnelles).

Si la politique nationale de traitement utilise à présent les ACT, le Niger n'a pas abandonné la chloroquine et il nous a paru important de surveiller l'évolution de son efficacité, ainsi que celle de la pyriméthamine, maintenant utilisée chez la femme enceinte. En collaboration avec le PNL, un Réseau de surveillance de la résistance aux antipaludiques (RSRA) a été créé. Il a pour objectifs de :

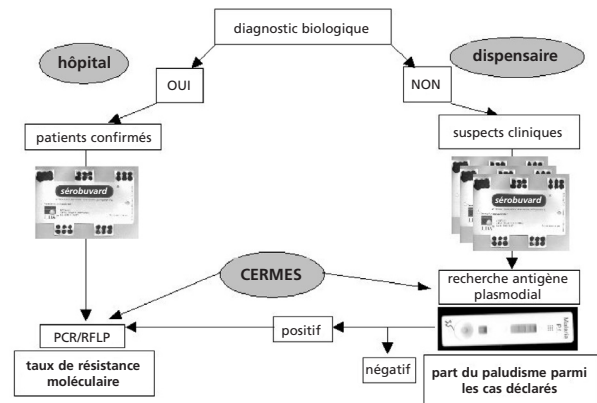
- surveiller la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques ;
- évaluer la prévalence des mutations de gènes d'intérêt ;
- cartographier les foyers de résistance et leur extension éventuelle.

Méthodologie

Le RSRA a été mis en place par le CERMES, en collaboration avec le Ministère de la santé publique et de la lutte contre les endémies (MSP/LE), dans le cadre global du réseau régional de surveillance des antipaludiques RAOTAP2 ; il comprend à la fois des hôpitaux et des centres de santé intégrés (CSI). Pour cet essai pilote, nous nous sommes limités à la vallée du fleuve Niger, incluant six départements et la ville de Niamey. La collecte mensuelle active des échantillons recueille des prélèvements de sang capillaire sur sérobuvar (Zoopole de Ploufragan, France). Chaque échantillon est identifié par un numéro, la date du prélèvement, le site d'étude, l'âge et le sexe du patient. Les échantillons confirmés positifs, soit par recherche différée d'antigène HRPII, soit par microscopie,

Figure 1.

Algorithme de collecte et de traitement des échantillons selon les capacités diagnostiques des établissements de santé.
Algorithm of collecting and treatment of the samples according to health centers diagnosis capacities



font l'objet de recherche des mutations ponctuelles (figure 1). Les mutations des gènes *pfcr* (chloroquine) et *dhfr* (pyriméthamine) sont détectées par PCR-RFLP après extraction de l'ADN par la méthode au phénol-chloroforme.

Résultats

Parmi les 258 échantillons testés pour la mutation *pfcr*76T, 103 provenaient de dispensaires et 155 des hôpitaux. Pour la mutation *pfdbhfr*108N, 54 échantillons provenaient de dispensaires et 32 des hôpitaux. Les prévalences moyennes des marqueurs *pfcr* et *pfdbhfr* sont respectivement de 50,8 % ($n = 258$) de souches mutées *pfcr*76T et 57,7 % ($n = 97$) de souches mutées *pfdbhfr*108N et 26,8 % des souches sont à la fois mutées au niveau des gènes *pfcr* et *pfdbhfr*. Globalement, la prévalence des mutations de *pfcr* ou *pfdbhfr* ne montre pas de différence selon le sexe ni l'âge. Les échantillons des hôpitaux montrent 52,3 % de mutation *pfcr*76T, *versus* 48,5 % dans les dispensaires. De même, la fréquence de la mutation *pfdbhfr*108N est de 62,8 % dans les hôpitaux et 53,7 % dans les dispensaires. Ces différences ne sont pas significatives. La distribution spatiale des mutations de *pfcr* ne fait pas apparaître de foyer de résistance dans la zone étudiée (figure 2). L'effectif des échantillons traités pour *pfdbhfr* ne permet pas une telle analyse. La distribution au cours du temps tend à montrer un pourcentage d'isolats présentant la mutation *pfcr*76T plus faible (test de χ^2 , $p = 0,059$, $n = 215$) en saison sèche, (décembre à juin, 44 %) qu'en saison des pluies, (juillet à novembre, 57 %), mais de manière non significative.

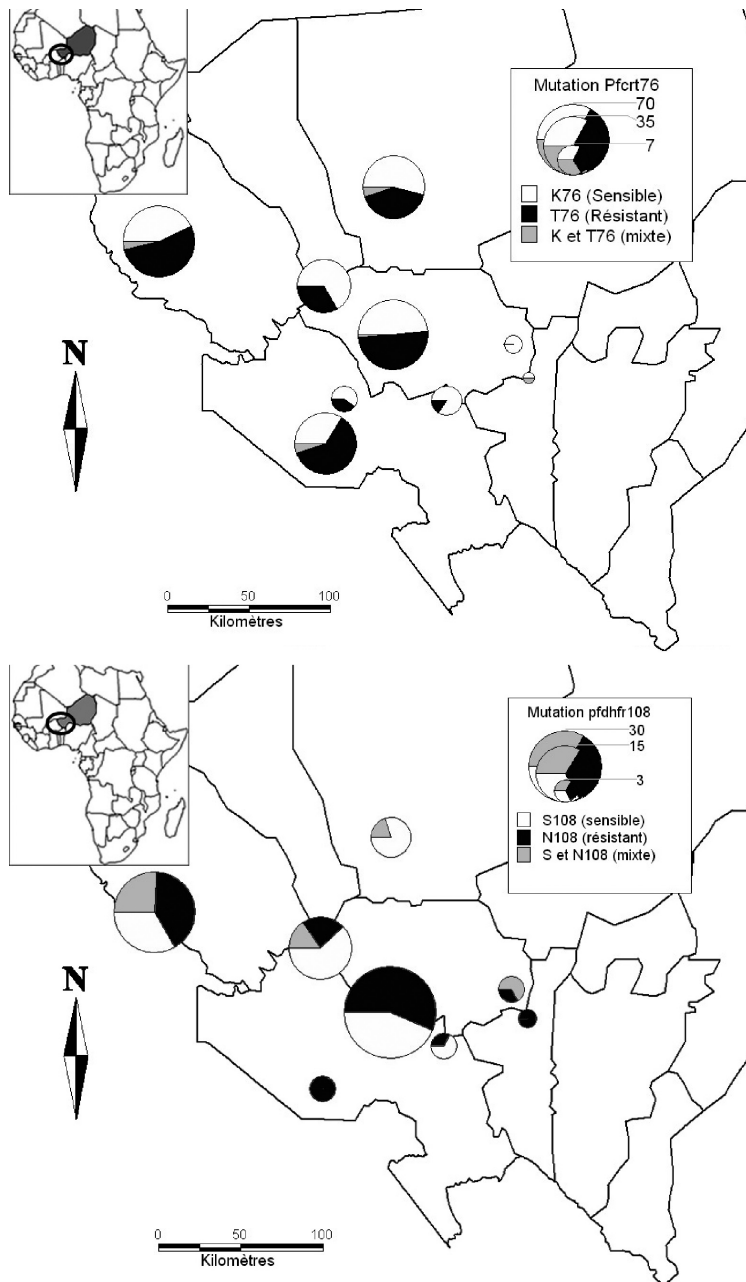
Discussion

Le taux de mutation *pfcr*76T dans la vallée du fleuve Niger est de 50,8 % ($n = 258$). Il est très proche des 45,7 % retrouvés à l'hôpital national de Niamey en 2003 (4). L'index d'échec génotypique est le rapport entre la prévalence de la mutation *pfcr*76T et le taux d'échec thérapeutique à la chloroquine. Il est de 2,45 au Mali (2) et de 2,3 au Burkina Faso (7). En appliquant à nos données une valeur de 2,4, le taux d'échec thérapeutique prédit serait de 20,1 % pour les enfants de 1 à 5 ans, ce qui n'est pas différent des 17,4 % trouvés par DUGELAY *et al.* (2003), ni des 20,9 % trouvés par PAROLA *et al.* (1999). Le taux de mutation *pfdbhfr*108N de 57,7 % ($n = 97$) n'est pas statistiquement différent des 60,2 % retrouvés à l'hôpital de Niamey en 2003 (4). Notre échantillonnage n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative

Figure 2.

Cartographie des mutations *pfcr* 76T (en haut) et *pfdhfr* 108N (en bas) dans la vallée du fleuve Niger, au Niger.

Mapping of 76T mutations of *pfcr* (above) and *pfdhfr* 108N (below) in the Niger River valley, in Niger.



En noir, la proportion d'échantillons testés présentant la mutation étudiée. Le diamètre des camemberts est proportionnel au nombre d'échantillons traités, comme indiqué dans chaque légende (nombres à gauche).

des prévalences observées des mutations *pfcr*76T et *pfdhfr*108N entre les hôpitaux et les dispensaires. Les hôpitaux arrivant en deuxième ou troisième position (après l'automédication et les dispensaires) dans le parcours au soin des patients, on aurait pu y attendre une sélection des allèles résistants. La poursuite future de ce programme permettra d'augmenter le recrutement d'échantillons, afin de confirmer ou infirmer, avec une puissance statistique supérieure, cette hypothèse.

La poly-chimiorésistance croisée ou simultanée est un défi majeur pour les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. En effet, nous trouvons 26,8 % de souches doublement mutées *pfcr*76T et *pfdhfr*108N, fréquence non différente d'une distribution au hasard des deux mutations. Néanmoins, ce chiffre est préoccupant en terme de santé publique, notamment pour la femme enceinte. L'extension de l'étude aux autres codons *pfdhfr* 51 et 59 s'avère indispensable.

L'intégration des données dans un système d'informations géographique visualise la distribution spatiale des résistances en mettant en exergue la présence de foyers de résistance. À terme, il sera possible de diriger les études cliniques vers des zones sensibles et proposer des stratégies adaptées de contrôle des cas de paludisme.

Conclusion

Notre procédure de recueil et de confirmation biologique est simple et le stockage et l'expédition des prélèvements faciles. En attendant l'utilisation en routine de moyens diagnostiques pour un grand nombre de malades, elle facilite le criblage moléculaire d'un nombre important de prélèvements à l'échelle d'un pays tel que le Niger et trouve une place privilégiée dans la stratégie de mise en place des réseaux de surveillance de la résistance de *P. falciparum*, aux côtés des enquêtes d'efficacité *in vivo*.

Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements aux personnels de santé des différents établissements de soins et aux patients qui ont permis la réalisation de cette étude. Ce texte a bénéficié de la lecture critique de Suzanne CHANTEAU et de Jean ROUX. Le financement de cette étude a été assuré par le Ministère français de la recherche, par l'Action concertée incitative « paludisme et maladies transmissibles associées pour les pays en développement PAL+ » et par le Ministère des affaires étrangères, par le fonds de solidarité prioritaire « Résistance aux anti-infectieux – volet paludisme ».

Références bibliographiques

- DJIMDÉ A, DOUMBO OK, CORTESE JF, KAYENTAO K, DOUMBO S *et al.* – A molecular Marker for chloroquine-Resistant *falciparum* Malaria. *N Eng J Med*, 2001, **344**, 257-263.
- DJIMDÉ A, DOUMBO OK, STEKETEE RW & PLOWE CV – Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet*, 2001, **358**, 890-891.
- DUGELAY F, ADEHOSSI E, ADAMOU S, OUSMANE I, PARZY D *et al.* – Efficacy of chloroquine in the treatment of uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria in Niamey, Niger, in 2001. *Ann Trop Med Parasitol*, 2003, **97**, 83-86.
- IBRAHIM ML, FRANÇOISE GA, ÉRIC A, VERONIQUE L, DUCHÉMIN J – Field based evidence for the linkage of *pfcr* and *pfdhfr* resistant malaria genotypes and clinical profiles of severe malaria in Niger. *Microbes and Infection*, 2007, **9**, 599-604.
- KUBLIN JG, DZINJALAMALA FK, KAMWENDO DD, MALKIN EM, CORTESE JF *et al.* – Molecular Markers for failure of sulfadoxine Pyrimethamine and chlorproguanil-Dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 2002, **185**, 380-388.
- PAROLA P, ALI I, DJERMAKOYE F, CRASSARD N, BENDAVID C *et al.* – Chloroquinosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la clinique Gamkalley et à la PMI des Forces armées nigériennes (Niamey, Niger). *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, **92**, 317-319.
- TINTO H, SANOU B, DUJARDIN JC, OUEÐRAOGO JB, VAN OVERMEIR C *et al.* – Usefulness of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of *in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 2005, **73**, 171-173.