

# Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de *Plasmodium falciparum*.

**J. Le Bras**

Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP), Laboratoire de parasitologie, Université Paris V & Hôpital Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France.

Journée SPE du 13 octobre 1999 à l'Institut Pasteur à Paris : "Génétique et maladies infectieuses dans l'environnement tropical".

## Summary: Mechanisms and Dynamics of Plasmodium falciparum Drug-Resistance.

*The emergence of chloroquine resistance has been associated with a dramatic increase in malaria mortality in some human populations from endemic regions. Plasmodium falciparum drug resistant malaria originates from chromosomal mutations. Analysis using molecular, genetic and biochemical approaches has shown that 1) impaired intake of chloroquine by the parasite vacuole is a common characteristic of resistant strains, the chloroquine-resistance mechanism regulates the access of chloroquine to hematin, this phenotype correlates with Pfmdr1 and Pfcr2 gene mutations; 2) one to four point mutations of dihydrofolate reductase, the enzyme target of antifolines (pyrimethamine and proguanil), give moderate to high levels of resistance to these drugs but there is a fitness cost to resistance; 3) the mechanism of resistance to sulfonamides and sulfones involves mutations of dihydropteroate synthase, their enzyme target; 4) treatment with sulphadoxine-pyrimethamine (SP) selected for the variants Ile(51), Arg(59) and Asn(108) of DHFR and for the variants Ser(436), Gly(437), and Glu(540) of DHPS; 5) clones that were resistant to some traditional antimalarial agents acquired resistance to new ones at high frequency (accelerated resistance to multiple drugs-ARMD). Amino-alcohol (quinine, mefloquine, halofantrine) mechanisms of resistance are still unclear. Population genetic studies have confirmed that selfing is more frequent in Plasmodium falciparum where the transmission rate is lower in some regions such as Papua-New Guinea, whereas isolates from individuals on the Thai-Burmese border, an area of hypoendemic transmission, revealed a higher number of genotypes per infected person. It has been suggested that intense intra-host competition between co-infecting clones, low numbers of genes required to encode resistance, and high drug usage all encourage the emergence of drug resistance. On the other hand, the greater effective recombination in high transmission areas may breakdown multiple drug resistance when it is coded for by two unlinked loci. Epidemiological studies have established that the frequency of chloroquine resistant mutants varies among parasite isolate populations while resistance to antifolines is highly prevalent in most malarial endemic countries (more than 92% of Kenyan field isolates have undergone at least one point mutation). Established and strong drug pressure as well as low antiparasitic immunity probably explains the multidrug-resistance encountered in forests of Southeast Asia and South America. In Africa, frequent genetic recombinations in Plasmodium originate from a high level of malaria transmission, and falciparum chloroquine-resistant prevalence seems to stabilise at an equal level as chloroquine-sensitive malaria. Clinical studies demonstrated that control of clinical symptoms is better when chloroquine is used with sulphadoxine-pyrimethamine (SP) than when SP is used alone, and the cure rate also tends to be higher with the triple combination regimen.*

## Résumé :

*Plasmodium falciparum est l'espèce plasmodiale la plus fréquente, la plus dangereuse et la principale concernée par la chimiorésistance. Les différents types de résistances identifiés ont pour origine des mutations chromosomiques. Le déficit de concentration du médicament dans le parasite est constant dans les souches résistantes à la chloroquine, ce phénotype étant fréquemment lié à un polymorphisme des gènes PfMDR1 et PfCR2. Les mutants résistants aux antifolines (pyriméthamine, proguanil) sont fréquents, ceux résistants à la fois à un antifolique et un antipaludique (sulphadoxine, dapson) sont plus rares, du moins en Afrique. Une à quatre mutations ponctuelles sur le gène de la cible des antifolines, la dihydrofolate-réductase, entraînent un niveau de résistance qui croît avec le nombre de mutations. Les résistances aux amino-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine) sont rares et leur mécanisme est mal élucidé. Une pression médicamenteuse très importante explique probablement la polychimiorésistance, fréquente dans les populations d'Asie du Sud-Est et d'Amérique du Sud forestière. En Afrique, une transmission élevée du paludisme entraîne un brassage génétique important des Plasmodium et la résistance à la chloroquine, l'antipaludique le plus utilisé, semble se stabiliser à 50 % environ des souches en circulation.*

## Key-words: Malaria -

Plasmodium falciparum -  
Drug resistance -  
Prophylactics -  
Treatment -  
Epidemiology

## Mots-clés : Paludisme -

Plasmodium falciparum -  
Résistance -  
Prophylaxie -  
Traitement -  
Épidémiologie

## Introduction

*Plasmodium falciparum* est l'agent causal de la forme la plus grave du paludisme humain. Les antimalariques sont la principale défense contre ce parasite et la chloroquine (Nivaquine®) est un des médicaments les plus utiles jamais développés. Les antifoliques et les antifoliniques sont, après la chloroquine, les antipaludiques les plus utilisés depuis 50 ans. La résistance (R) de *P. falciparum* à ces composés est apparue 1 an (antifolates) à 15 ans (chloroquine) après leur mise sur le marché. Depuis 20 ans, la chimio-R de l'agent du paludisme grave s'étend et augmente en Afrique. Les souches chloroquino-R de *P. falciparum* sont fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques qui contribuent à augmenter la mortalité paludéenne chez les sujets sans immunité (33). Au cours des dix années écoulées, de nombreux génotypes associés à la R de *P. falciparum* aux antipaludiques majeurs ont été identifiés. Un ou plusieurs gènes chromosomiques, une ou plusieurs mutations, selon les molécules concernées, rendent compte du phénotype R. Des recombinaisons intragéniques peuvent survenir lors de la méiose chez le moustique vecteur, *Anopheles sp.* Chez l'homme, où le parasite est haploïde, l'infection est le plus souvent polyclonale. En Afrique, la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) (S/P) est, avec l'amodiaquine (Camoquine®, Flavoquine®), la seule disponible actuellement pour un traitement à coût acceptable de l'accès présumé paludéen dans les pays où la chloroquino-R est fréquente. La chloroquine et le proguanil (Paludrine®), qui est le précurseur d'un analogue de la pyriméthamine (Daraprim®), sont les seuls médicaments utilisables pour la chimioprévention des femmes enceintes et des nourrissons. Le coût élevé et/ou les effets indésirables de la quinine (Quinimax®), de la méfloquine (Lariam®), de l'halofantrine (Halfan®), de l'atovaquone-proguanil (Malarone®) et des dérivés de l'artémisinine (Paluther®) limitent fortement leur intérêt. Le retard au développement et à l'évaluation de la tolérance de thérapeutiques originales de coût modéré ne laisse pour les dix ans à venir aucune autre option thérapeutique pour un nombre attendu de plusieurs milliards d'accès paludéens. Le choix d'un de ces traitements impose de comprendre les principes de la distribution des populations plasmodiales résistantes et de leur évolution dans le temps et l'espace en relation avec la pression médicamenteuse. Ni les tests *in vivo* ni les tests *in vitro* n'ont permis cette approche par le passé.

## Particularités du génome de *P. falciparum*

La divergence du génome nucléaire de *Plasmodium falciparum* au cours de son évolution a été importante. Par exemple, l'utilisation de A/T dans les codons est d'environ 82 %, alors qu'il n'est que de 67 % chez *P. vivax*. A l'inverse, les contraintes fonctionnelles ont maintenu un génome mitochondrial identique à plus de 90 % entre les espèces plasmodiales (21). Le polymorphisme est élevé et ne concerne pas que les gènes codant les protéines reconnues par l'hôte. L'étude du polymorphisme de séquences répétées associé aux mutations qui ont été à l'origine de la chloroquino-R a confirmé la migration d'est en ouest (Asie du Sud-est, Indes, Afrique de l'Est, Afrique de l'Ouest) des souches R (11, 32). Du fait que le parasite est haploïde pendant la majorité de son cycle, toute modification expérimentale d'un caractère monogénique (transfection, recombinaison homologue site-spécifique "gene knockout", etc.) se traduira par une perte ou une acquisition de fonction. Ceci permet d'élucider les mécanismes sous-jacents à la chimio-R. Ainsi peuvent être discriminés les gènes responsables ou simplement liés à la R (36).

## La résistance à la chloroquine et aux lysosomotropes

### Mécanisme de résistance

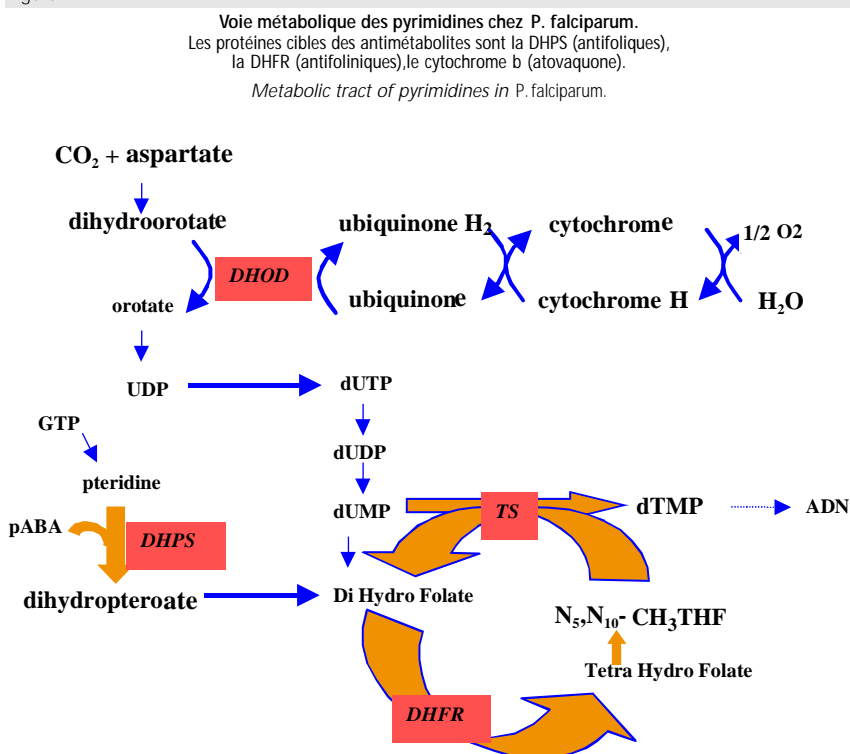
L'activité la plus spectaculaire de la chloroquine est sa capacité à se concentrer à partir de niveaux nanomolaires hors du parasite jusqu'à des niveaux millimolaires dans la vacuole digestive du trophozoïte érythrocytaire. C'est à ce niveau qu'elle inhibe la digestion de l'hémoglobine et qu'elle se fixe à l'hématine (5). La caractéristique commune des isolats R est une altération de l'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. Les théories dominantes suggéraient que ces défauts d'accumulation étaient dus à une altération des gradients de pH et/ou de la perméabilité membranaire en conséquence d'un mécanisme d'efflux. Il apparaît maintenant que la chloroquino-R implique une captation diminuée de la molécule. Une spécificité structurale élevée de l'accumulation de médicaments est observée, ce qui implique le rôle soit d'un transporteur/perméase spécifique ou d'une molécule associée à l'hématine dans la vacuole digestive (28). Un regain d'intérêt pour les composés quinoléiniques a suivi la démonstration que la chloroquino-R est réversible par le verapamil, un modulateur de la R dans les cellules cancéreuses de mammifères multi-résistantes (MDR). Cette découverte a abouti à la localisation dans la membrane de la vacuole digestive de *P. falciparum* d'une protéine, Pgh1, analogue aux P-glycoprotéines surexprimées dans les cellules cancéreuses où elles fonctionnent comme des pompes expulsant les médicaments cytotoxiques (ATP-binding cassette transporter). Des variations dans le nombre de copies du gène *PfMDR1*, le gène correspondant situé sur le chromosome 5, associées ou non avec des mutations ponctuelles, ont été initialement considérées. Il n'y a pas d'évidence d'amplification de ce gène avec la chloroquino-R. Le transport de la chloroquine par les cellules exprimant une protéine Pgh1 modifiée (substitution A->T du codon 86) est altéré. Des mutations ponctuelles de *PfMDR1* sont liées à la chloroquino-R en Afrique (3, 6). L'allèle *PfMDR1*<sub>A86T</sub> pourrait contribuer à la R à la chloroquine et à l'amodiaquine (10). Lors d'expériences de recombinaison homologue, des gènes ségrégeant avec la chloroquino-R ont été retrouvés chez *P. falciparum* et *P. chabaudi* (7). Le gène *PfCG2*, situé sur le chromosome 7, code une protéine transmembranaire localisée dans la membrane de la vacuole parasitophore et dans celle de la membrane digestive (32). Un polymorphisme complexe de ce second gène associé à la chloroquino-R (figure 1) est retrouvé dans les clones chloroquino-R africains de *P. falciparum* mais avec des exceptions (11). La transfection de ce génotype ne suffit pas à conférer la R à la chloroquine. Très récemment, un troisième gène candidat, *PfTCR*, situé sur le chromosome 7 à proximité de *PfCG2*, a été identifié et des mutations ponctuelles de ce gène sont retrouvées lors des échecs thérapeutiques de la chloroquine (WELLEMS, communication personnelle).

Figure 1.

Structure du gène *PfCG2* codant une intégrine de 330 kDa : le polymorphisme associé à la chloroquino-résistance comprend 12 mutations ponctuelles (1 à 12) et une structure commune des régions répétées (kappa-oméga).  
Structure of the *PfCG2* gene coding a 330kDa integrine.



Figure 2.



## La résistance à la pyriméthamine, au proguanil et aux autres antimétabolites

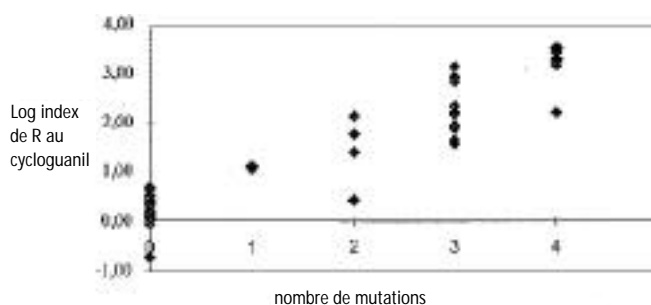
### Mécanisme de résistance

Les plasmodiums humains peuvent utiliser les purines de leur hôte mais doivent synthétiser leurs pyrimidines (figure 2). Les mutations ponctuelles du gène *PfDHFR* sont les bases moléculaires de la R de *P. falciparum* à la pyriméthamine et au cycloguanil (1). Les isolats de *P. falciparum* provenant d'échecs prophylactiques du proguanil ou d'échecs thérapeutiques de la sulfadoxine/pyriméthamine présentent une R *in vitro* à la fois au cycloguanil et à la pyriméthamine. La substitution S108N est la mutation primaire associée à la R à la pyriméthamine ou au cycloguanil en Afrique et en Asie du Sud-est. En Amérique du Sud, on rencontre également la substitution S108T (22). Les mutations additives les plus fréquentes sont N51I et C59R. La CI<sub>50</sub> moyenne de cycloguanil augmente avec le nombre de mutations (figure 3) (1). Une simple substitution Asn en 108 ou Thr en 108 sur la dihydrofolate réductase (DHFR) recombinante du parasite réduit l'affinité de la molécule sans affecter le fonctionnement de l'enzyme vis-à-vis de son substrat naturel. Les mutations multiples diminuent l'efficacité de l'enzyme sur le dihydrofolate, ce qui suggère que des mutations additionnelles soient défavorables aux parasites en l'absence de pression médicamenteuse (30). Pour *PfDHFR*, en prenant pour seuil de R une CI<sub>50</sub> de 50 nmol L<sup>-1</sup> de cycloguanil, 95 % des 148 isolats de voyageurs ayant un codon sauvage en position 108 (Ser) sont sensibles et 91 % des 68 isolats ayant une substitution de la sérine par l'asparagine au codon 108 (S108N) sont résistants (12, 14, 25). La mutation S108N est retrouvée chez 95 % des isolats de voyageurs en échec prophylactique du proguanil en France (n = 55). Au Cameroun, les isolats présentant la mutation S108N de *PfDHFR*, seule ou associée à une mutation du codon 59, ont une réponse clinique au Fansidar<sup>®</sup> adéquate (RCA) et

ceux ayant trois mutations de *PfDHFR* entraînent un échec thérapeutique précoce (ETP) ou tardif (ETT) (4). Dans des conditions physiologiques, la concentration sanguine en folates peut influencer l'effet de la sulfadoxine, ceci pouvant expliquer des échecs du Fansidar<sup>®</sup> sur des isolats de *P. falciparum* avec la seule mutation S108N sur *PfDHFR*. Il a été initialement évoqué que des mutations sur le gène de la dihydroptéroate synthétase (*PfDHPS*, la cible des antifoliques) pourraient être responsables de la R à la sulfadoxine (34). Effectivement, des mutants *PfDHPS* sont sélectionnés durant un traitement sulfadoxine/pyriméthamine (9). La progénie d'un croisement génétique entre parents sulfadoxine -S et sulfadoxine -R démontre une liaison étroite entre les mutations de la *PfDHPS* et la R et une liaison complète entre les mutations multiples de la *PfDHFR* et la R (35). La valeur prédictive des mutations de la DHPS dans l'étude précédente est médiocre. Au Kenya et en Tanzanie, les isolats présentant la mutation S108N de *PfDHFR*, seule ou associée à une mutation du codon 59, ont une réponse *in vivo* au Fansidar<sup>®</sup> de type RCA (n = 3/3) ou ETT (n = 6/17) et tous ceux (n = 13) ayant trois mutations de *PfDHFR* ont une réponse de type ETP ou ETT (35). La valeur prédictive des mutations de la DHPS dans cette étude est ici aussi médiocre. En Amazonie péruvienne, les 24 isolats présentant la mutation S108N ou la mutation S108T de *PfDHFR* isolée ont une réponse *in vivo* au Fansidar<sup>®</sup> de type S (n = 11), R1 (n = 8), R2 (n = 4) ou R3 (n = 1) et tous ceux (n = 21) ayant 3 mutations ou plus de *PfDHFR* ont une réponse de type R1 à R3 (17). La valeur prédictive de l'échec thérapeutique des mutations de la DHPS dans cette étude est ici de 21/34. Si la R croisée est démontrée entre le cycloguanil et la pyriméthamine, le potentiel thérapeutique des autres antifoliques (comme chlorproguanil plus dapsone) vis-à-vis des souches résistantes à la sulfadoxine/pyriméthamine reste cependant une question ouverte (9). L'atovaquone, dont la cible est supposée être le cytochrome b dans la voie métabolique des pyrimidines (figure 2) (31), est, en association avec le proguanil, disponible pour le traitement du paludisme. Comme pour les antifoliques, l'utilisation de l'atovaquone non associée contre *P. falciparum* sélectionne rapidement des mutants résistants (37).

Figure 3.

Le niveau de résistance aux antifoliques augmente avec le nombre de mutations sur le gène de la dihydrofolate-réductase.  
*The level of resistance to antifolicals rises as a function of the number of mutations on the gene of dihydrofolate reductase.*



## La chimiorésistance multiple

On entend par paludisme polychimiorésistant une R à plusieurs antimalariques observée chez *Plasmodium falciparum*. Cette R peut être croisée ou simultanée. La R simultanée est principalement la conséquence d'une utilisation simultanée importante de plusieurs antipaludiques induisant une forte pression sélective. Ainsi, en Asie du Sud-est, la R à la chloroquine s'est complétée d'une R à la pyriméthamine-sulfadoxine à mesure que cette dernière relayait, à un coût similaire de traitement, la chloroquine. Par contre, en Afrique de l'Ouest, la R à la chloroquine et aux antifoliques n'est pas encore associée et la fréquence des bi-R est généralement égale au produit des fréquences individuelles de R (18). La R croisée entre des antipaludiques est un phénomène lié à la communauté de leurs modes d'action et sans doute de leurs mécanismes de R. Une corrélation étroite est observée entre les sensibilités au cycloguanil et à la pyriméthamine de 314 isolats africains ( $r = 0,9$ , données CNRCP). Les parasites ayant atteint un haut niveau de R à la chloroquine, comme en Asie du Sud-est, sont généralement résistants à l'amodiaquine. Il en serait de même, dans cette région, entre la méfloquine et l'halofantrine. Les arguments épidémiologiques ne permettent pas de discriminer, dans l'origine de la multi-chimioR, observée en particulier en Asie du Sud-est, le rôle d'un mécanisme de R commun vis-à-vis de divers antipaludiques de celui d'une sélection indépendante de la R à chaque composé. En effet, la pression médicamenteuse a été importante et multiple dès le début des années 50, associant, pour les lysosomotropes, la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, puis la méfloquine après 1980. Il n'a pas été observé de R multiple en l'absence d'utilisation notable des antipaludiques correspondants. Un même mécanisme de R empêchant l'accumulation de plusieurs composés par certaines souches de *P. falciparum* des zones frontalières de la Thaïlande pourrait cependant expliquer la polychimio-R fréquente dans ces régions d'hypoendémie. Il ne s'agit cependant pas de populations clonales de parasites car les malades hébergent majoritairement plusieurs clones (26). Il pourrait s'agir de phénotypes de "R accélérée à plusieurs médicaments" tels que ceux mis en évidence au laboratoire (27). Dans les régions d'Afrique de savane, une hétérogénéité d'efficacité des antipaludiques a été observée par de nombreux auteurs, avec d'excellentes réponses à des doses inférieures au régime standard de chloroquine ou de quinine (en l'absence de prémunition) ou des réponses médiocres à des doses standards de méfloquine (avant son introduction dans ces régions). Il ne s'agit cependant pas dans ce dernier cas d'une situation de multi-chimioR. L'analyse de corrélation est la première indication d'un mode d'action et éventuellement de R communs. *In vitro*, il est possible d'apprécier la réponse d'une même souche vis-à-vis de plusieurs antipaludiques et donc de comparer l'action des différents antipaludiques lysosomotropes sur une population de parasites. Ainsi, pour les souches africaines de *P. falciparum* importées en France, la variation du niveau de sensibilité à la monodéséthyl-amodiaquine, le métabolite qui rend compte de l'efficacité de l'amodiaquine, est explicable par le niveau de sensibilité à la chloroquine. L'échec de l'amodiaquine chez les sujets infestés par des souches fortement chloroquino-résistantes y trouve son explication. Il pourrait en être de même pour expliquer des échecs de l'halofantrine sur des souches méfloquino-résistantes. La corrélation inverse observée entre la chloroquine et la méfloquine ou l'halofantrine reflète une situation de tendance inverse: les souches chloroquino-sensibles sont volontiers moins sensibles à la méfloquine ou l'ha-

lofantrine et *vice versa* en Afrique (23, 29). Les arguments *in vitro* sont donc plutôt en faveur d'un mécanisme commun de R entre la chloroquine et l'amodiaquine, d'une part, et entre la méfloquine et l'halofantrine, d'autre part (2). Les arguments cliniques ne confirment pas une R croisée fréquente entre la chloroquine et l'amodiaquine (24).

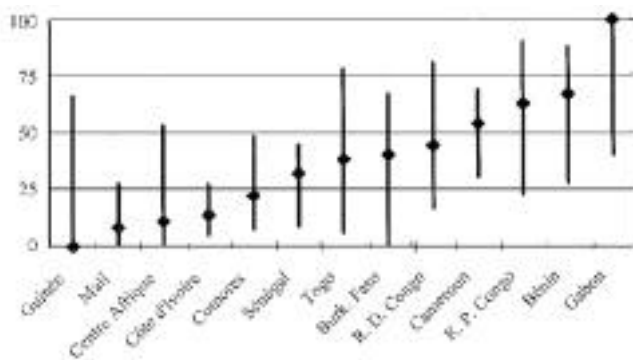
## La génétique des populations de parasites chimio-résistants

Nos connaissances sur la génétique des populations de *Plasmodium falciparum* augmentent rapidement. L'autofécondation est plus fréquente quand le niveau de transmission est bas avec des coefficients de consanguinité respectifs de 0,33 et 0,92 pour certains sites en Tanzanie et Papouasie-Nouvelle Guinée (PNG). Ces différences géographiques dans les modes de fécondation ont été reliées au rythme d'extension de la chloroquino-R qui serait plus rapide en PNG qu'en Tanzanie. Une fréquence élevée de fécondation croisée pourrait ralentir l'extension des R causées par plusieurs gènes dont les loci sont éloignés (13). Un polymorphisme restreint existerait par ailleurs dans les populations de *Plasmodium falciparum* des îlots de transmission comme les foyers fluviaux d'Amazonie (ARIEY, communication personnelle). Le facteur biologique le plus important dans l'évolution des populations R est la nature du contrôle de l'infection paludéenne, qui est essentiellement le fait de la réponse immunitaire de l'hôte. Des modélisations ont été proposées dont celle de la régulation des clones infestants en fonction de la fréquence initiale (avant usage du médicament) des allèles chimio-R, de la dynamique de la R sous pression médicamenteuse, du seuil de R en dessous duquel la R n'évolue pas (15). L'émergence de la chimio-R est facilitée par la pression médicamenteuse pour les R causées par un nombre limité de gènes (DHFR-R par exemple) et du fait d'une compétition entre les clones co-infestants l'hôte. Les clones chimio-R présents au début de la pression médicamenteuse ont une moindre probabilité de survie que ceux qui les suivront, ceci dépendant de la vitesse de stabilisation de la population de parasites après le début d'utilisation du médicament (16). La probabilité de survie d'un clone R augmenterait linéairement avec la pression médicamenteuse, la pente étant fonction du niveau de transmission. La sélection des multi-R codées par des gènes à des loci indépendants pourrait être contrebalancée par la recombinaison (19). En zone de transmission élevée, le repas anophélien comporte en moyenne 3 génotypes, ce qui suffit à assurer une recombinaison méiotique chez *P. falciparum* plus élevée que chez l'homme. Ce fort taux de recombinaison efface très rapidement le déséquilibre de liaison des loci distants de plus de 0.3 Kb (8). Ceci confirme que les infestations humaines sont polyclonales et les recombinaisons de méiose des parasites sont fréquentes dans les régions de paludisme stable à fort polymorphisme des *Plasmodium*. L'indépendance de la chloroquino-R et de la R aux antifoliques est observée dans la plupart des pays d'Afrique (18). Cette observation est logique dans une hypothèse de fécondation croisée entre clones différents, compte-tenu que les génotypes associés à ces deux types de R sont sur des chromosomes différents : *PfDHFR* (chr 4), *PfMDR1* (chr 5), *PfCG2* et *PfTCR* (chr 7), ce qui facilite les réassociations des génotypes dans la progéniture. Ces éléments, comme pour la prévention des R du VIH, encouragent l'usage d'une triple association. L'amodiaquine-sulfadoxine-pyriméthamine, qui est bien tolérée et constamment efficace dans des essais limités, pourrait être utilisée en attente de schémas thérapeutiques originaux de coût et de tolérance acceptables (20).

Figure 4.

Fréquence des bi-résistances à la chloroquine et aux antifoliques (pyriméthamine & proguanil) de *P. falciparum* en Afrique en 1996-1998. Données des cas importés en France sans chimioprophylaxie (CNRPC). Les barres représentent les intervalles de confiance 95%.

Frequency of bi-resistances to chloroquine and antifolines (pyrimethamine & proguanil) of *P. falciparum* in Africa in 1996-1998.



## Conclusion

Les R chez *P. falciparum* sont liées à une ou plusieurs mutations chromosomiques associées. L'amplification n'a pas été observée mais une surexpression des protéines ou des différences d'accumulation des médicaments pourrait expliquer les différences de sensibilité pour un même profil de mutation. La réversion de R et les éventuels désavantages des souches mutantes par rapport aux souches sauvages ne sont pas connus. Les niveaux et proportions de chimio-R, qui présentent une hétérogénéité régionale (figure 4), sont probablement explicables par la pression médicamenteuse, en particulier par des médicaments d'élimination lente comme la sulfadoxine-pyriméthamine ou la méfloquine. Une seule mutation ponctuelle, facilement sélectionnée par la pression médicamenteuse, suffit pour donner une R à un antimétabolite. Elle apparaît en de multiples foyers, sa fréquence est élevée pour *PfDHFR*. La moitié des isolats africains étudiés porte au moins une mutation, ce qui suffit à rendre inefficace le proguanil ou la pyriméthamine non associés. La proportion d'isolats présentant 3 mutations et plus, résistants à l'association sulfadoxine/pyriméthamine, n'est pas connue. La R à la chloroquine, plus complexe, correspond probablement à plusieurs mutations simultanées de fréquence d'apparition faible (et d'apparition sans doute unique à la fin des années 50 puis dispersées par migration). Elle relève d'un phénotype empêchant l'accumulation de la drogue. Sa prévalence globale, en Afrique, est de l'ordre de 50%, sans évidence d'augmentation depuis une décennie, mais avec des fluctuations géographiques importantes. La R à la quinine, à la méfloquine et à l'halofantrine est probablement due à des mécanismes du type de ceux qui sont observés pour la chloroquine. À la différence de la chloroquine, ces composés n'expriment pas, actuellement, de hauts niveaux de R et leur activité reste, selon les régions, complète ou partielle. La situation la plus critique est en jungle thaïlandaise, cambodgienne et birmane où la poly-chimioR est fréquente depuis 1980. Cette situation, qui correspond à une très faible proportion du paludisme mondial, est une singularité préoccupante mais précieuse pour l'étude des polychimio-R et de leurs traitements. L'usage des antipaludiques en alternance en zone d'endémie étant illusoire, il paraît essentiel de les associer lors du traitement comme lors de la chimioprévention afin de limiter l'extension des génotypes de R.

## Références bibliographiques

- BASCO LK, ELDIN DE PÉCOULAS P, WILSON C, LE BRAS J & MAZABRAUD A - Point mutation in the dihydrofolate reductase gene as the molecular basis for pyrimethamine and cyclo-guanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, **69**, 135-138.
- BASCO LK & LE BRAS J - *In vitro* activity of halofantrine and relationship to other standard antimalarials against African isolates and clones of *P. falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.*, 1992, **47**, 521-527.
- BASCO LK, LE BRAS J, RHOADES Z & WILSON MC - Analysis of pfmdr 1 and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Sub-Saharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, **74**, 157-166.
- BASCO LK, TAHAR R & RINGWALD P - Molecular basis of *in vivo* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *P. falciparum* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**, 1811-1814.
- BRAY PG, MUNGTIN M, RIDLEY RG & WARD SA - Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Molec Pharmacol.*, 1998, **54**, 170-179.
- BRAY PG & WARD SA - A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, 1998, **77**, 1-28.
- CARLTON J, MACKINNON M & WALLIKER D - A chloroquine resistance locus in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, **93**, 57-72.
- CONWAY DJ, ROPER C, ODUOLA AMJ, ARNOT DE, KREMSNER PG *et al.* - High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Nat Acad Sci Usa*, 1999, **96**, 4506-4511.
- CURTIS J, DURAISINGH MT & WARHURST DC - *In vivo* selection for a specific genotype of dihydropteroate synthetase of *P. falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not by chlorproguanil-dapsone treatment. *J Infect Dis*, 1998, **177**, 1429-1433.
- DURAISINGH MT, DRAKELEY CJ, MULLER O, BAILEY R, SNOU-NOU G *et al.* - Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr 1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 1997, **114**, 205-211.
- DURAND R, GABBETT E, DI PIAZZA JP, DELABRE JF & LE BRAS J - Analysis of kappa and omega repeats of cg2 gene and chloroquine susceptibility in fresh isolates of *P. falciparum* from sub-Saharan Africa. *Molec Biochem Parasitol*, 1999, **101**, 185-197.
- DURAND R, RAMILIARISOA O, SÉCARDIN Y, ELDIN DE PÉCOULAS P, BASCO LK & LE BRAS J - DHFR gene point mutation as a predictor of *Plasmodium falciparum* resistance to cycloguanil in malaria cases from Africa imported to France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 460-461.
- DYE C & WILLIAMS BG - Multigenic drug resistance among inbred malaria parasites. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 1997, **264**, 61-67.
- ELDIN DE PÉCOULAS P, BASCO LK, LE BRAS J & MAZABRAUD A - Association between antifolates resistance *in vitro* and DHFR gene point mutation in *Plasmodium falciparum* isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 181-182.
- HASTINGS IM - A model for the origins and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology*, 1997, **115**, 133-141.
- HASTINGS IM & MACKINNON MJ - The emergence of drug-resistant malaria. *Parasitology*, 1998, **117**, 411-417.
- KUBLIN JG, WITZIG RS, SHANKAR AH, ZURITA JQ, GILMAN RH *et al.* - Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet*, 1998, **351**, 1629-1630.
- LE BRAS J, DURAND R, DI PIAZZA JP, PRADINES B, LONGUET C & PARZY D - Prise en compte des disparités de résistance de *P. falciparum* en Afrique dans la décision chimioprophylactique. *Presse Méd*, 1998, **27**, 1419-1423.
- MACKINNON MJ - Survival probability of drug resistant mutants in malaria parasites. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 1997, **264**, 53-59.
- McINTOSH HM & GREENWOOD BM - Chloroquine or amodiaquine combined with sulfadoxine-pyrimethamine as a treatment for uncomplicated malaria - a systematic review. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998, **92**, 265-270.
- McINTOSH MT, SRIVASTAVA R & VAIDYA AB - Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, **95**, 69-80.
- NZILA-MOUDA A, MBERU EK, SIBLEY CH, PLOWE CV, WINSTANLEY PA & WATKINS WM - Kenyan *P. falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorocyclo-guanil

- activity *in vitro* and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, **42**, 164-169.
23. ODUOLA MJ, MILHOUS WK, WALKER O & DESJARDINS RE - Reduced *in vitro* susceptibility to mefloquine in West African isolates of *P. falciparum*. *Lancet*, 1987, **2**, 1304-1305.
  24. OLLIARO P, NEVILL C, LE BRAS J, RINGWALD P, MUSSANO P *et al.* - Amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. A systematic review of published and unpublished data. *Lancet*, 1996, **348**, 1196-1201.
  25. 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**, 646-650.
  26. PAUL REL, HACKFORD I, BROCKMAN A, MULLER GRAF C, PRICE R *et al.* - Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **58**, 195-203.
  27. RATHOD PK, MCERLEAN T & LEE PC - Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 9389-9393.
  28. RIDLEY RG - Malaria: dissecting chloroquine resistance. *Current Biology*, 1998, **8**, R346-R349.
  29. SIMON F, LE BRAS J, GAUDEBOUT C & GIRARD PM - Reduced sensitivity of *P. falciparum* to mefloquine in West Africa. *Lancet*, 1988, **1**, 467-468.
  30. SIRAWARAPORN W, SATHITKUL S, SIRAWARAPORN R, YUTHAVONG Y & SANTI DV - Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, **94**, 1124-1129.
  31. SRIVASTAVA I, ROTTENBERG H & VAIDYA A - Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug collapses mitochondrial membrane potential in malaria parasites. *J Biol Chem*, 1997, **272**, 3961-3966.
  32. SU XZ, KIRKMAN LA, FUJIOKA H & WELLEMS TE - Complex polymorphisms in a 330-kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 1997, **91**, 593-603.
  33. TRAPE JF, PISON G, PREZIOSI MP, ENEL C, DULOU AD *et al.* - Impact de la résistance à la chloroquine sur la mortalité palustre. *CR Acad Sci Paris, Sciences de la Vie*, 1998, **321**, 689-697.
  34. TRIGLIA T & COWMAN AF - The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Update*, 1999, **2**, 15-19.
  35. WANG P, READ M, SIMS PF & HYDE JE - Sulfadoxine resistance in the human parasite *P. falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation. *Molec Microbiol*, 1997, **23**, 979-986.
  36. WATERS AP, THOMAS AW, VANDIJK MR & JANSE CJ - Transfection of malaria parasites. *Methods*, 1997, **13**, 134-147.
  37. WHITE NJ - Why is it that antimalarial drug treatments do not always work? *An Trop Med Parasitol*, 1998, **92**, 449-458.