

EVALUATION DE LA CHIMIORÉSISTANCE À LA SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE ET DES MUTATIONS DES GÈNES DIHYDROFOLATE RÉDUCTASE ET DIHYDROPTEROATE SYNTHÉTASE DANS LE DISTRICT DE SANTÉ DE NDU AU NORD-OUEST, CAMEROUN

Nfor E. N.^{1,2}, Mbacham W. F.^{1,*}, Njifutie Njikam^{1,2}, Mbuli I. A.¹,
Tawe B.¹, Masumbe N.P.¹, Venyoka A.³

¹ Centre de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université de Yaounde I

² Département de Biologie et Physiologie Animales

³ Hôpital d'Arrondissement de Ndu

Adresse pour correspondance: wmbacham@yahoo.com, BP 8094, Yaoundé, Cameroun

RESUME:- Les données cliniques sur la résistance au sulfadoxine-pyriméthamine (SP) sont peu précises dans plusieurs localités du Cameroun. En plus, très peu d'informations sont disponibles sur la corrélation entre les marqueurs moléculaires, la résistance et l'échec du traitement avec SP. Dans l'optique de mieux appréhender cette situation, nous avons entrepris d'évaluer l'efficacité du sulfadoxine-pyriméthamine (SP), ainsi que le potentiel des marqueurs moléculaires dans le suivi de la résistance dans trois sites du district de santé de Ndu. 296 patients de tout âge infectés par la forme non compliquée de *Plasmodium falciparum* ont été soumis à un traitement au SP pendant la période d'avril 2001 à novembre 2004, et les résultats évalués. Une évaluation des mutations des gènes de dihydrofolate réductase (*dhfr*) et dihydroptéroate synthétase (*dhps*) du *P. falciparum* dans le sang de 100 patients d'âges inférieurs ou égaux à 10 ans a été effectuée le jour de leur admission en clinique. Les résultats obtenus indiquent 51,28% de patients qui donnent des réponses cliniques et parasitologiques adéquates, 33,33% d'échec thérapeutique précoce, 4,49% d'échec thérapeutique tardif, et 9,89% d'échec parasitologique tardif. Les mutations de la Gly437 ont été retrouvées dans 37% des échantillons. L'indice génotypique de résistance calculé suivant ce marqueur était de 0,76. Les mutations liées à la Asn108 ont été retrouvées dans 87% des échantillons, avec un indice génotypique de résistance de 1,79. En conclusion, il découle de nos résultats cliniques et moléculaires que la thérapie SP aurait un effet thérapeutique de courte durée dans le district de santé de Ndu. D'autre part, les génotypes mutants *dhfr* et *dhps* seraient des facteurs potentiels d'alerte précoce dans l'augmentation de la résistance au SP.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, *dhps*, *dhfr*; marqueurs moléculaires, SP

INTRODUCTION

Le paludisme demeure une cause majeure de souffrance et de mortalité parmi les enfants et les femmes enceintes en Afrique sub-saharienne. De manière globale, le paludisme est responsable de 350-500 millions de cas d'admissions en clinique, et reste un problème de santé publique pour 2,4 milliards d'individus, représentant 40% de la population mondiale réunis dans plus de 90 pays.

Au-delà de 60% et 90% de cas cliniques et de décès dus au paludisme arrivent en Afrique au sud du Sahara, où un enfant succombe chaque 30 seconds (WHO, 2002). Le paludisme se retrouve géographiquement sur le territoire Camerounais. Les données recueillies auprès du Programme National de Lutte contre le Paludisme indiquent que près de 900, 000 cas cliniques sont déclarés chaque année, soit 35-40% de consultations cliniques. La thérapie sulfadoxine-pyriméthamine est l'un des rares médicaments

moins cher, présentant une innocuité relative, et qui est encore efficace contre la forme de paludisme résistante à la chloroquine en Afrique. De toute façon, le développement rapide de résistance du *Plasmodium falciparum* à la SP suite à son usage à large échelle représente une menace sérieuse face aux efforts de contrôle du paludisme dans les pays endémiques. La sulfadoxine-pyriméthamine, une combinaison de deux principes antifoliques qui agissent au niveau de deux étapes successives de la voie folique du parasite, s'est révélée comme un substituant approprié de la chloroquine, avec un usage à large échelle en Afrique (Bloland *et coll.*, 1993). La sulfadoxine inhibe le gène de la dihydroptéroate synthétase (*dhps*), alors que la pyriméthamine inhibe le gène de la dihydrofolate réductase (*dhfr*) dans la voie folique du parasite. Cette combinaison agit de façon synergétique contre *P. falciparum*. L'émergence de la résistance à cette thérapie est due aux séquences variantes du gène de *dhfr* du *P. falciparum*, après une accumulation de mutations, principalement aux codons 108, 164, 59, et 51 (Plowe *et coll.*, 1996). Ces mutations altèrent la configuration du site actif où les inhibiteurs du DHFR fixe l'enzyme, et par conséquent réduisent l'affinité pour le principe actif. Ces mutations du gène de *dhfr* peuvent avoir une action spécifique, ou agir en association avec celles du gène de *dhps* aux codons 437 pour initier la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine. Les manifestations primaires de la résistance se traduisent par l'augmentation de la fréquence des recrudescences sans signes immunitaires, avec des accès aigus de paludisme. Dans les zones endémiques, ces manifestations émergent chez les enfants au système immunitaire peu développé, avec une charge parasitaire élevée. Ceci justifie l'attention particulière qu'il faut accorder au cas des enfants (White, 1999). A la lumière de ce qui précède, une meilleure compréhension de la dynamique de la maladie, associée aux données moléculaires liées à la structure de la population des parasites est indispensable dans la conception et la mise en œuvre des politiques de contrôle du paludisme, avec une optimisation des prescriptions et de l'efficacité des médicaments en vue.

MATERIELSET METHODES

Sites d'étude

Les études ont été menées à l'hôpital de district de Ndu, à la clinique de Ndu Tea Estate, et au centre urbain de santé intégrée de Ndu, tous appartenant à la délégation de santé publique de district de Ndu. Ce district de santé publique fait parti des sites d'études de la résistance aux antipaludiques du Programme National de Lutte contre le Paludisme. Les données épidémiologiques classent cette

zone de l'Ouest Cameroun comme méso endémique. Les circonscriptions hospitalières de cette zone sont rurales et de caractéristiques socio-économiques similaires.

Recrutement des participants d'étude

Les patients se présentant dans les centres hospitaliers étaient soumis aux examens parasitologique et clinique par un personnel qualifié, et recrutés pour l'étude après un consentement écrit. Il était demandé à ces sujets de donner leur histoire sanitaire. Eventuellement, les patients ayant une température corporelle au-delà de 37,5°C, une charge parasitaire supérieure à 1000 parasites par microlitre de sang, une absence de condition fébrile due à d'autres infections, une absence de malnutrition, et une habilité à se soumettre aux visites de suivi étaient recrutés pour l'étude. Des frottis sanguins épais et minces étaient préparés à partir du sang recueilli au bout du doigt, colorés au Giemsa et ensuite observés au microscope pour détecter et identifier des parasites.

Traitement des patients

Les patients retenus pour l'étude étaient traités avec de la SP (Fansidar®, 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine; Roche, Basel, Switzerland) à une dose unique orale de 1,25 mg/kg de pyriméthamine et 25mg/kg de sulfadoxine et observés pendant 30 minutes. En cas de vomissement durant cette période, une autre dose était administrée en remplacement et l'observation prolongée durant 30 minutes additionnelles. Il était demandé aux patients jeunes (enfants) et leurs tuteurs de revenir dans les centres de santé 3, 7, et 14 jours après le traitement pour une évaluation des effets subséquents.

De plus, et en cas d'effets secondaires (montée ou persistance de température élevée, aggravation des symptômes de la maladie), il leur était recommandé de se présenter à tout moment dans les centres de santé. D'autre part, au cas où certains patients ne se présentaient pas au rendez-vous de suivi, un membre de l'équipe d'étude leur rendait visite à domicile. Pendant chaque visite de contrôle, des examens cliniques et parasitologiques étaient effectués sur les patients.

En cas d'aggravation des symptômes justifiant une hospitalisation, d'administration d'autres formes de principes antipaludiques, d'indisponibilité d'un patient, ou d'une requête expresse du tuteur d'un enfant demandant à ne plus faire partie de l'étude, ces derniers étaient remplacés par d'autres volontaires. Selon le protocole d'évaluation de l'efficacité *in vivo* des principes actifs antipaludiques (WHO, 2002) dans les zones de forte

transmission, les résultats de cette étude étaient classifiés de la manière suivante: Réponse Clinique et Parasitologique Adéquat (RCPA) ; Echec Thérapeutique Précoce (ETP) ; Echec Thérapeutique Tardif (ETT), et Echec Parasitologique Tardif (EPT). En cas d'échec du traitement, des doses standards de sulfate de quinine étaient administrées aux patients suivant le schémas indiqué pour le paludisme grave.

Collecte des échantillons, extraction de l'ADN, et analyse des mutations.

Du papier filtre (3MM; Whatman Hillsboro, OR) était imprégné du sang recueilli au bout du doigt des sujets avant le recrutement, séché à l'air libre, et conservé dans des sacs plastiques à sangle étanche contenant du gel de silice et transportés au laboratoire de santé publique et biotechnologie. L'ADN était alors extrait du papier filtre par la méthode de Chelex. Les amplifications par PCR suivi par les digestions a base des enzymes de restriction ont été réalisées par analyse des produits des codons 108 et 437 pour *dhfr* et *dhps* respectivement. Les produits d'amplification digérés par les enzyme de restriction étaient analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 20% pendant 60 minutes à 70 volts. La coloration était faite au bromure d'éthidium, et le résultat photographié et conservé. L'indice génotypique de résistance (IGR) était calculé comme le rapport de la prévalence des génotypes résistants divisé par la prévalence d'échec thérapeutique.

RESULTATS

Au terme de l'étude, 296 patients ont participé, soit 115 de la clinique de Ndu Tea Estate, 106 de l'hôpital de district de Ndu, et 75 du centre urbain de santé intégré de Ndu. De tous ces sujets traités à la SP, 140 (51,28%) ont donné des réponses cliniques et parasitologiques adéquate (RCPA), 91 (33,33%) des échecs thérapeutiques précoces (ETP), 15 (4,49%) des échecs thérapeutiques tardifs (ETT), et 27 (9,89%) des échecs parasitologiques tardifs (EPT) respectivement (Tableau 1). 19 patients ont été perdus de vue et n'ont pas pu poursuivre l'étude jusqu'à son terme.

Les études des mutations ont été réalisées sur 100 échantillons prélevés des enfants. Sur la base de différentes combinaisons des mutations dans *dhfr* et *dhps* comme marqueurs de résistance à la SP, nous avons évalué les indices génotypiques de résistance (IGR) pour les deux gènes. Les résultats obtenus indiquent que 41% des isolats portent l'allèle purement primitif Ala437, 22% un mélange des allèles Ala437 et Gly437, et 37% l'allèle mutant pure Gly437. 87% des isolats portent la mutation

Asn108. D'autre part, 8,5% portent des gènes non mutants, alors que 4,5% portent un mélange de gènes mutants et non mutants.

Tableau 1: Données relatives au traitement avec la SP

	0 – 10 ans	Au-delà de 10 ans	Total
RCPA	39(37,5%)	101(59,76%)	140(51,28%)
ETP	42(40,38%)	49(28,99%)	91(33,33%)
ETT	5(4,81%)	10(5,91%)	15(4,49%)
EPT	18(17,31%)	9(5,32%)	27(9,89%)
Taux d'échec	65(62,5%)	68(42,23%)	133(48,71%)
Hématocrite moyen	65%		
Taux de perte de vue	19(6,5%)		

Tableau 2: Prévalence des génotypes mutants de *dhfr* et *dhps* et estimation de IGR

Gène	Allèle	Pourcentage	
<i>dhps</i>	Ala437 primitif (sensible)	41%	IGRs 0,76
	Gly437 mutant (résistant)	37%	
	Allèles mixtes	22%	
<i>dhfr</i>	Ser108 primitif (sensible)	8,5%	IGRf 1,79
	Asn108 mutant (résistant)	87%	
	Allèles mixtes	4,5%	

DISCUSSION

Comme contribution à l'étude de la résistance aux principes antipaludiques au Cameroun, cette investigation avait pour but l'élucidation des facteurs liés à l'utilisation de la SP comme traitement du paludisme dans le district de santé de Ndu, et plus spécifiquement, les limites de son efficacité, et la prévalence de ses marqueurs moléculaires de résistance. Il découle des résultats obtenus que la SP est peu efficace contre les formes non compliquées du paludisme dans le département de santé de Ndu. D'autre part, la RCPN établie est de 51,28%, valeur proche de celle obtenue à Limbé (59,5%), dans le Sud-ouest du Cameroun (Mbacham *et coll.*, 2005).

L'usage étendu de la SP au Cameroun pendant les années écoulées comme médicament de substitution serait responsable de la prévalence de résistance observée. Nous avons relevé que le génotype mutant était associé à l'échec de la SP à partir du 14^{ème} jour de traitement. Cette observation suggère qu'il y aurait une relation entre l'apparition de ces marqueurs et l'émergence de la résistance, soulignant du même fait l'importance de ce génotype comme facteur d'alerte de l'escalade de la résistance à la SP dans Ndu. Les indices génotypiques de

la résistance (IGR) obtenus par combinaisons des mutations de *dhfr* et *dhps* étaient très variables. Les études menées au Cameroun dans les années, 1998 par Basco et Ringwald (1998a, b) montrent que la prévalence des mutations étaient de 23-43%. Donc cette prévalence croissante est davantage démontrée par cet étude (59% pour G437 et 93% pour N108). Par conséquent, des investigations ultérieures devraient être menées afin de définir le rôle de ces marqueurs dans le contrôle de la résistance à la SP. Les résultats obtenus représentent des données préliminaires sur l'efficacité de la SP, et sur la prévalence des génotypes *dhfr* Asn 108 et *dhps* Gly 437 à Ndu. Il découle des résultats cliniques et moléculaires obtenus dans cette étude que la SP aurait un faible indice thérapeutique à brève échéance à Ndu. Par conséquent, il y a une urgence qui s'impose dans l'usage rationnel du médicament, et une surveillance régulière de la résistance. D'autre part, des efforts devraient être consentis dans la recherche de thérapies alternatives, et particulièrement les combinaisons de principes antipaludiques. Les données obtenues soulignent l'évidence que les génotypes mutants de *dhfr* et *dhps* pourraient constituer un outil d'alerte de l'augmentation de la résistance à la SP à Ndu. Pour mieux appréhender la relation entre les mutations et l'échec du traitement, nous recommandons des études longitudinales dans plusieurs sites et centre de santé. Ces études devraient insister sur l'utilisation des génotypes mutants pour estimer l'étendu de la résistance. Ces indices ont été utilisés par Plowe *et coll.*, (1996); Duraisingh *et coll.*, (1998) pour mettre en évidence certain spécificité régionales des mutations et démontrer son utilité pour suivre l'évolution et la prédiction de la chimiorésistance à la SP (Omar *et coll.*, (2001). De plus, ces études devraient être conçues de manière à tenir compte des facteurs de discernement tels que l'âge des sujets et le taux de parasitemie chez les patients. Des études ultérieures sont vivement souhaitées sur d'autres types de mutations, aussi bien dans la communauté que dans les centres de santé, pour étayer l'usage potentiel des génotypes de *dhfr* et *dhps* dans l'estimation de la résistance à la SP.

REMERCIEMENTS

Nous sommes vivement reconnaissants vis-à-vis des institutions qui ont financé cette étude, entre autres la Fobang Foundation, Cameroun, New England Biolabs Foundation, Massachusetts, USA, l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO-TDR), Genève et l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (projet# - RAF6025), Vienne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Basco, L.K., and Ringwald, P. (1998a). Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. I. Analysis of point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58: 369-73.
- Basco, L.K., Ringwald, P. (1998b). Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. II. Baseline frequency of point mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58: 374-7.
- Bloland, P. B., Lackritz, E. M., Kazembe, P. N., Were, J. B., Steketee, R. and Campbell, C. C. (1993). Beyond chloroquine: Implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *Journal of Infectious Diseases* 167,932-937.
- Duraisingh, M.T., Curtis, J., and Warhurst, D., (1998). *Plasmodium falciparum*: Detection of polymorphism in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes by PCR and restriction digestion. *Experimental Parasitology* 89: 1-8.
- Mbacham, W., Evehe M., Mbuli, A., Akaragwe, I., Tawe, B., Djoko, C., Gang, B., Masumbe, P., Atogho, B., Ebeng, R., (2005). Therapeutic efficacy of Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®) and mutation rates to Antifolate genes in different regions of Cameroon. *Acta Tropica*, 95S: 337.
- Omar, S.A., Adagu, I.S., and Warhurst, D.C., (2001). Can pretreatment screening for *dhps* and *dhfr* point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyriméthamine treatment failure? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 315-319.
- Plowe, C. V., Djimde, A., Wellems, T. E., Diop, S., Kouriba, B., and Doumbo, O. K., (1996). Community pyriméthamine-sulfadoxine use and prevalence of resistant *Plasmodium falciparum* genotypes in Mali: A model for deterring resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55 (5): 467-471.
- White, N. J., (1999). Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Phil. Transactions Royal Society London*, 354: 739-749.
- World Health Organisation, (2002). Assessment of therapeutic efficacy of anti-malarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. *WHO/MAL/2002*.