



**HAL**  
open science

# Résistance de l'agent du paludisme, *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs) : Craintes d'une chimiorésistance généralisée

Françoise Benoit-Vical, Lucie Paloque, Jean-Michel Augereau

► **To cite this version:**

Françoise Benoit-Vical, Lucie Paloque, Jean-Michel Augereau. Résistance de l'agent du paludisme, *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs) : Craintes d'une chimiorésistance généralisée. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2016, 200 (3), pp.477-490. hal-03232081

**HAL Id: hal-03232081**

**<https://hal.science/hal-03232081>**

Submitted on 21 May 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## COMMUNICATION

### **Résistance de l'agent du paludisme, *Plasmodium falciparum* aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs) : Craintes d'une chimiorésistance généralisée**

MOTS-CLÉS : PALUDISME. ARTÉMISININE. RÉSISTANCE. PARASITE. *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies (ACTs): Fears of widespread drug resistance

KEY-WORDS: MALARIA. ARTEMISININ. DRUG RESISTANCE. PARASITE. *Plasmodium falciparum*

Françoise BENOIT-VICAL , Lucie PALOQUE, Jean-Michel AUGEREAU

**Françoise BENOIT-VICAL déclare être co-auteur des brevets # US61/904651 et # US62/062439 déposés par l'Institut Pasteur.**

## RÉSUMÉ

*L'utilisation, depuis plus de 15 ans, dans le traitement du paludisme de combinaisons thérapeutiques associant un dérivé de l'artémisinine avec une molécule partenaire (dénommées ACTs pour Artemisinin-based Combination Therapies), a permis une diminution notable de la mortalité dans les régions tropicales et subtropicales. Cependant ces progrès sont gravement menacés par la diminution de l'efficacité clinique des artémisines caractérisée par une clairance parasitaire retardée et un taux de recrudescence élevé, et rapportée dès 2008 dans l'Ouest du Cambodge. Cette résistance de Plasmodium aux artémisines s'est déjà étendue à plusieurs pays du Sud-est Asiatique. Cependant les ACTs restent efficaces tant que la molécule partenaire garde son activité, mais de plus en plus d'échecs*

\* Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS ; Équipe « Nouvelles molécules antipaludiques et approches pharmacologiques » ; UPR8241 ; 205 route de Narbonne ; BP 44099 ; 31077 Toulouse cedex. Françoise.Vical@inserm.fr

Tirés à part : Professeur Françoise BENOIT-VICAL, même adresse

Article reçu le 18 février 2016, accepté le 21 mars 2016

*cliniques sont aujourd'hui corrélés à la résistance du parasite à la fois à l'artémisinine et à la molécule associée. Une des craintes majeures est la diffusion de ces parasites aux multiples résistances en Afrique subsaharienne, continent le plus touché par le paludisme, comme cela fut le cas par le passé avec d'autres traitements antipaludiques.*

*Il est donc indispensable de mieux comprendre, d'un point de vue phénotypique et génotypique, la résistance du parasite Plasmodium falciparum à l'artémisinine et à ses dérivés afin de proposer de nouveaux outils thérapeutiques.*

## SUMMARY

*Malaria treatment with ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies), combining a chemical derivative of artemisinin, and a partner drug has, for more than 15 years, produced a notable decrease in the mortality in tropical and subtropical areas. However, since 2008, a serious threat has emerged in western Cambodia, where the clinical efficacy of artemisinins has significantly declined, with a delayed parasite clearance rate and high recrudescence rates in the following weeks. Resistance of Plasmodium to artemisinins is now reported in several countries in South-East Asia. ACTs remain effective as long as the partner drug retains its activity but more and more clinical failures related to parasite resistance to both artemisinin and the partner molecule are reported. A major concern is the diffusion of these resistant parasites in sub-Saharan Africa, the continent most affected by malaria, as was the case in the past with other antimalarial treatments.*

*It is therefore essential to better understand, from phenotypic and genotypic points of view, the mechanisms of resistance developed by the parasite Plasmodium falciparum face artemisinin and its derivatives in order to offer new therapeutic tools.*

## INTRODUCTION

Le paludisme causé par des parasites du genre *Plasmodium* est transmis par les moustiques femelles infectés du genre *Anopheles*. Le paludisme, géo-localisé aux zones tropicales et subtropicales, est un problème de santé majeur pour plus de 3,2 milliards de personnes mais il représente également un risque important pour des millions de voyageurs. Au cours des 15 dernières années, des progrès considérables ont été accomplis dans la lutte contre le paludisme menant à une réduction de 60 % du nombre des décès au niveau mondial [1]. Cette diminution notable est due, particulièrement en Afrique sub-saharienne, à la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide, aux stratégies de lutte anti-vectorielle, à l'utilisation des tests de diagnostic rapide et aux traitements curatifs par des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine dont l'abréviation ACTs correspond au terme anglais Artemisinin-based Combination Therapies [1]. Cependant, le fardeau que représente cette maladie parasitaire reste très élevé avec environ 214 millions de nouveaux cas en 2015 et un tribut inacceptable de plus de 438 000 morts en 2014 dont plus de 300 000 sont des enfants de moins de 5 ans [1]. Par ailleurs, ces avancées considérables risquent d'être annihilées par l'émergence et la diffusion de parasites

résistants aux ACTs. De plus, cette résistance basée sur un mécanisme de quiescence ne peut être détectée par les tests *in vitro* habituellement utilisés pour surveiller la sensibilité du parasite *Plasmodium* aux médicaments utilisés sur le terrain.

## LES MOLÉCULES DE LA FAMILLE DES ARTÉMISININES

L'artémisinine (ART) est une molécule isolée d'une armoise commune *Artemisia annua*, utilisée traditionnellement dans le traitement des fièvres, notamment palustres, en Chine depuis plus de 2000 ans. L'identification de cette substance active a été récompensée en 2015 par l'attribution du Prix Nobel de Médecine au Pr Y. Tu [2].

Les molécules de la famille des artémisinines (ARTs) sont une composante clé des récents succès dans la lutte contre le paludisme. Les ARTs permettent une diminution plus rapide de la parasitémie et de la fièvre que les médicaments antipaludiques conventionnels [3]. Au cours des deux dernières décennies, les combinaisons à base d'artémisinine (ACTs) ont remplacé les quinolones et les antifolates comme médicaments de première intention dans le traitement du paludisme simple dans la plupart des pays d'endémie. L'usage des ACTs est massif avec 337 millions de doses de traitements utilisés en 2014 [1].

Les ARTs agissant sur les parasites au stade le plus jeune, dit « anneau », ces derniers sont rapidement éliminés des globules rouges et de la circulation sanguine [4] ce qui empêche donc leur maturation et leur séquestration. Ces propriétés confèrent aux ARTs une efficacité supérieure à la quinine dans le traitement du paludisme grave et compliqué au point d'être devenus le traitement de première ligne pour les patients qui en sont atteints [5]. Le traitement précoce avec des ARTs est également associé à une diminution du nombre de gamétocytes et donc à une diminution de la transmission [3].

Pour réduire le risque de chimiorésistance, la recommandation est d'utiliser les ARTs en combinaison avec d'autres agents antipaludiques. Cependant en décembre 2014, huit pays, principalement en Afrique (Angola, Cap-Vert, Colombie, Guinée équatoriale, Gambie, Sao Tomé-et-Principe, Somalie, Swaziland) proposaient toujours dans leur politique de santé des ARTs en monothérapies en dépit de leur interdiction préconisée par l'OMS, augmentant ainsi le risque de sélection de résistance à cette classe de molécules [6].

## LA RÉSISTANCE AUX ACTs SUR LE TERRAIN

### La définition

D'après la définition de l'OMS, la résistance à l'artémisinine (artémisinine se réfère ici à l'artémisinine et à ses dérivés) correspond à une clairance parasitaire retardée après un traitement par artésunate en monothérapie, ou après un traitement avec

une thérapie combinée à base d'artémisinine (ACT) [7]. Le délai de clairance parasitaire ne conduit pas nécessairement à l'échec thérapeutique mais la résistance à l'artémisinine pourrait faciliter la sélection de la résistance au médicament partenaire. Par ailleurs, dans certaines zones de la région du Grand Mékong, la résistance concomittante à l'artémisinine et au médicament partenaire (méfloquine, pipéraquline) entraîne de réels échecs thérapeutiques aux traitements par ACT [7].

### L'épicentre

La région située le long de la frontière thaïlando-cambodgienne, et plus particulièrement la province de Pailin, a toujours été l'épicentre des résistances développées par *P. falciparum* suivie d'une propagation vers les autres continents d'endémie palustre [8], comme ce fut le cas, dès 1957, avec la résistance à la chloroquine.

Cette spécificité régionale peut s'expliquer par: i) le faible accès aux médicaments qui génère un trafic de médicaments contrefaits, de mauvaise qualité, et contenant des doses sub-thérapeutiques, ii) l'utilisation de monothérapies, iii) une forte population de migrants qui ont peu ou pas accès au système de santé [9, 10]. D'un point de vue moléculaire, aucune corrélation entre la chimiorésistance et un taux de mutations accru du génome parasitaire n'a été trouvée dans ces régions, invalidant l'hypothèse d'un parasite « hypermutant » [11]. La résistance aux ARTs est héréditaire et repose donc sur une base génétique [12, 13] qui semble avoir été sélectionnée parmi une population de parasites prédisposés présentant un polymorphisme des gènes *fd* (ferrodoxin), *arps10* (apicoplast ribosomal protein S10), *mdr2* (multidrug resistance protein 2) et *crt* (chloroquine resistance transporter). Ces travaux indiquent que le risque d'émergence de nouvelles mutations causant la résistance aux ARTs est favorisé par des facteurs génétiques spécifiques au sein d'une population parasitaire [14].

### L'émergence et la diffusion (Figure 1)

Des signes alarmants de résistance aux ARTs ont émergé en 2006, le long de la frontière thaïlando-cambodgienne, le Cambodge étant le premier pays à avoir adopté les ACTs comme traitement de première ligne dans leur politique nationale (artésunate / méfloquine et dihydroartémisinine / pipéraquline).

Des analyses rétrospectives indiquent que la résistance aux ARTs a probablement émergé en 2001 [7].

En 2008, Noedl, et *al.* a rapporté une résistance à l'artésunate corrélée à une clairance parasitaire retardée en Thaïlande et au Cambodge [15]. Dondorp, et *al.* [16] a confirmé cette réduction de l'efficacité de l'artésunate en monothérapie à Pailin (ouest du Cambodge) caractérisée par un temps de clairance parasitaire lent (72-84 h *versus* 48-54 h) et des taux plus élevés d'échecs cliniques dus à une recrudescence parasitaire comparativement à Wang Pha (nord-ouest de la Thaïlande).

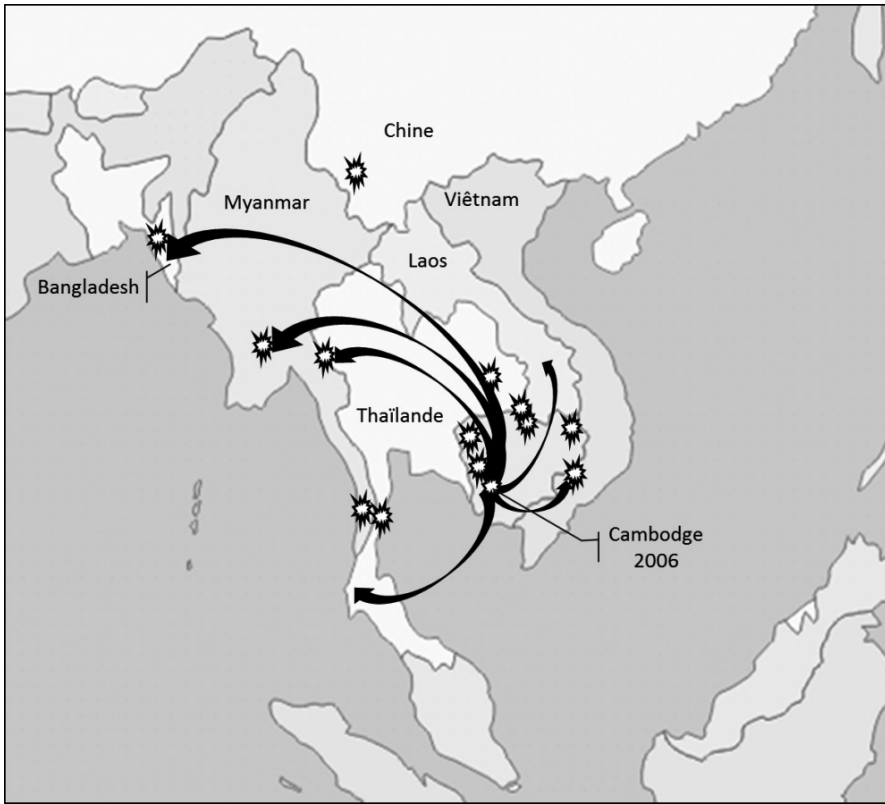


FIG. 1. — Émergence et diffusion de la résistance de *P. falciparum* aux artémisinines. Adapté d'après [14, 45, 46]

La résistance à l'artésunate en monothérapie est maintenant installée non seulement en Thaïlande et au Cambodge mais aussi au Myanmar, au Viêtname et au Laos [7].

A ce jour, aucune résistance aux ACTs n'est rapportée en Afrique mais la menace est aggravée par la démonstration récente que les parasites résistants aux artémisinines et originaires d'Asie semblent capables d'infecter et d'être transmis par un large panel d'espèces d'anophèles, dont la principale espèce africaine *Anopheles gambiae* [17]. Quand on sait que 80 % des morts dus au paludisme sont concentrés dans 15 pays, essentiellement en Afrique [1], la détection précoce de la résistance aux ACTs sur ce continent devient une priorité majeure. Dans les zones où la transmission est élevée, comme en Afrique, les niveaux accrus d'immunité face au parasite *Plasmodium* des populations contribuent à une clairance parasitaire rapide. Ainsi une étude récente préconise l'utilisation, en Afrique, d'un seuil d'alerte de 5 % de cas présentant une parasitémie détectable au 3<sup>e</sup> jour après traitement par ACTs, au lieu des 10 % utilisés par l'OMS en Asie [18].

### **L'impasse thérapeutique**

Année après année, le nombre de morts et de cas de paludisme sévère diminuent mais ces avancées sont fragiles [19] et l'OMS ne peut que constater l'augmentation significative des cas de résistance [7].

Dans les ACTs, le choix de la molécule partenaire des ARTs est basé sur l'absence de résistance des parasites, mais aussi sur les propriétés pharmacocinétiques de cette molécule qui possède une demi-vie de plusieurs jours à plusieurs semaines alors que celle des ARTs est limitée à quelques heures. De ce fait, les parasites restants, à la suite de l'action de l'ART, se retrouvent rapidement face à la seule molécule partenaire augmentant ainsi le risque de générer une nouvelle résistance. La résistance des parasites aux ARTs amplifie ce phénomène qui se traduit déjà sur le terrain par des échecs de traitement aux ACTs. Ces derniers ont seulement été observés pour l'instant en Asie du sud-est où, en plus de la résistance aux ARTs, les parasites peuvent être aussi résistants à la molécule partenaire (comme la méfloquine [20] ou la pipéraquine [21, 22]). Dans de tels cas, le traitement par l'ACT déficient est remplacé par un autre dont l'efficacité thérapeutique est évaluée tous les deux ans afin d'adapter le traitement au plus vite [1].

Ces résistances mettent en péril les progrès accomplis pour contrôler et éliminer le paludisme et sont donc une préoccupation majeure de santé publique. Cette situation est d'autant plus critique qu'il n'existe actuellement aucun médicament susceptible de remplacer les ACTs [7]. Parmi les candidats-médicaments en cours d'étude, nombreux sont des peroxydes au mécanisme d'action proche des ARTs faisant craindre des résistances croisées. D'autres composés chimiquement différents sont en phase II d'étude clinique (ferroquine, spiroindolones, imidazolopiperazines, etc.) [23] et leur utilisation est prévue, pour la plupart, en association avec un dérivé de l'ART [24].

### **LA QUIESCENCE : Un nouveau mécanisme de résistance développé par *P. falciparum***

#### **Première mise en évidence**

La demi-vie de clairance parasitaire chez un patient est définie comme le temps nécessaire pour que la parasitémie soit réduite de moitié consécutivement à un traitement antiparasitaire. Son allongement est associé à un risque accru de recrudescence parasitaire et fait donc l'objet de suivis épidémiologiques. Ce sont ces retards de clairances parasitaires après traitement qui ont permis la mise en évidence de la résistance clinique aux ARTs.

Étonnamment, il n'est pas possible de corrélérer cette résistance clinique aux ARTs et aux ACTs avec une perte de la chimiosensibilité des parasites à ces molécules, déterminée *in vitro* avec le test standard de l'OMS [16] et basé sur la mesure du taux de multiplication des plasmodies soumises à des concentrations croissantes de ces

composés. Si ce test permet de révéler facilement la résistance aux antipaludiques conventionnels comme les quinoléines et antifolates, il ne parvient pas pour autant à mettre en évidence une sensibilité réduite aux ARTs, ce qui conduit à envisager un mécanisme de résistance fondamentalement différent. Les retards de clairance et les taux de recrudescence *in vivo* ont suggéré que certains parasites peuvent survivre au traitement et sont ensuite capables de reprendre leur cycle de maturation cellulaire, une fois l'artémisinine éliminée. Ces parasites étaient suspectés présenter un métabolisme réduit telles des « belles au bois dormant » [4] sur lesquelles le traitement n'avait plus d'effet.

La résistance aux ARTs apparaît donc liée à un nouveau mécanisme cellulaire tout à fait distinct de ceux décrits pour les autres antipaludiques et qui impliquent des mutations soit de transporteurs soit de la cible.

### Quiescence / dormance

Il a été démontré grâce aux études menées sur la lignée F32-ART (une lignée parasitaire établie *in vitro* et hautement résistante à l'ART, capable de survivre à des doses élevées d'ART correspondant à 7000 fois la valeur de la  $CI_{50}$  observée avec la lignée parentale F32-Tanzania) puis confirmé sur des isolats du Cambodge, que la résistance de *P. falciparum* aux ARTs est médiée par un mécanisme de type quiescence/dormance, c'est-à-dire un arrêt du cycle cellulaire, expliquant ainsi que les parasites apparaissent toujours sensibles dans les tests standards de chimiosensibilité *in vitro* [25-28].

Ces parasites quiescents sont à l'origine des clairances retardées ainsi que des recrudescences parasitaires observées une fois que les concentrations plasmatiques en antipaludiques chez le patient sont descendues en dessous de leur seuil d'efficacité. Les études cinétiques de prolifération des parasites *in vitro* ont par la suite montré que seul un faible nombre de parasites survivent au traitement complet et sont ensuite capables de se développer à nouveau une fois le médicament éliminé.

Cette capacité à entrer en quiescence n'est pas une exclusivité des parasites résistants aux ARTs. Elle se retrouve également chez plusieurs souches de parasites de laboratoire sensibles après une exposition aux dérivés de l'ART [29, 30] et se traduit par des cinétiques de prolifération parasitaire et des taux de recrudescence variables. Cela suggère que la capacité de quiescence induite par les ARTs est une propriété intrinsèque de *P. falciparum* [29, 31]. Cependant la capacité de quiescence et de recrudescence des parasites résistants aux ARTs après exposition à la DHA (dihydroartémisinine) est 10 à 1000 fois plus élevée que celle des souches sensibles [25-27].

Par ailleurs, des phases de repos/quiescence sont également connues chez d'autres espèces de *Plasmodium*, tels les hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax* et de *P. ovale*, responsables de rechutes plusieurs semaines ou mois après la guérison du patient, mais ces formes spécifiques sont absentes chez *P. falciparum*.



### Les stades concernés

La quiescence se met en place, en présence d'ARTs, au tout premier stade du cycle érythrocytaire du parasite, appelé « anneau » en raison de sa forme caractéristique. Cependant ce phénomène ne concerne qu'une infime partie des parasites au stade « anneau », ce qui lui confère un caractère très particulier comparativement aux autres mécanismes de résistance connus qui affectent généralement tous les individus d'une population clonale [26, 29]. Par ailleurs, les parasites résistants aux ARTs ont un développement ralenti au stade anneau [32], ce qui pourrait favoriser leur mise en quiescence lors d'un traitement par ARTs. Au sein même de cette population de parasites au stade anneau, il a été démontré que l'âge des parasites après invasion du globule rouge est un facteur important dans leur capacité à résister. Ainsi, après un traitement de 6 heures en présence de 700 nM de DHA, les parasites au stade anneau, âgés de 0 à 3 heures post-invasion (test RSA<sup>0-3h</sup> ; Ring-stage Survival Assay), ont une capacité de quiescence plus de cinq fois supérieure à celle des stades âgés de 9 à 12 heures [33]. Cette capacité d'entrer en quiescence a été également rapportée au stade suivant (trophozoïte ; 13-16 heures post-invasion) pour les parasites hautement résistants aux ARTs de la lignée F32-ART5 [27].

### Quiescence et chimiorésistance

Le phénomène de quiescence en relation avec un traitement médicamenteux est bien connu en bactériologie et en oncologie. Les cellules cancéreuses humaines, par exemple, peuvent survivre à une chimiothérapie en arrêtant leur cycle cellulaire en phase G1 [34]. Par ailleurs, des dérivés synthétiques de l'ART induisent un arrêt du cycle cellulaire en G0 / G1 dans les lignées cellulaires cancéreuses et diminuent le nombre de cellules entrant en phase S [35]. Chez *Plasmodium*, le stade anneau impliqué dans la quiescence, correspondrait à la phase G1 du cycle cellulaire [36]. Des parallèles peuvent être ainsi établis entre les parasites résistants aux ARTs comme ceux de la lignée F32-ART et les cellules souches cancéreuses : i) arrêt de leur cycle cellulaire en phase G1 ; ii) capacité à résister à la chimiothérapie ; iii) faible proportion de la population cellulaire capable d'échapper au traitement en entrant en quiescence ; iv) implication de protéines CDK (cycline-dependent kinases) [26, 37].

### LE GÈNE *Pfk13*, MARQUEUR MOLÉCULAIRE LIÉ A LA RÉSISTANCE À L'ARTÉMISININE

Sans marqueur moléculaire, il était impossible de déterminer si de nouveaux foyers émergents de résistance aux ARTs étaient le résultat de la propagation de parasites résistants ou si la résistance apparaissait *de novo*. De plus, la diffusion de la résistance aux ARTs était difficile à appréhender. En effet, les modèles de résistance existants, établis sur la résistance aux antifolates, aux 4-amino-quinolines et aux

aryl-amino-alcools, étaient inadaptés à ce nouveau mécanisme développé par le parasite face aux ARTs. Seule une approche originale associant la biologie, la génomique, la clinique et l'épidémiologie a permis l'identification d'un marqueur moléculaire associé à la résistance aux ARTs. La comparaison du génome complet séquencé de la souche de laboratoire résistante F32-ART à celui de sa souche jumelle restée sensible a conduit à l'identification chez F32-ART d'une mutation ponctuelle dans la région en hélice de la protéine Kelch dont le gène est porté par le chromosome 13 [25]. L'étude du polymorphisme du gène *Pfk13* dans des isolats résistants du Cambodge a démontré l'étroite corrélation entre la présence de ce gène muté et la résistance des parasites chez les patients. Le rôle central du locus k13 dans la résistance de *P. falciparum* aux ARTs a été confirmé par des modifications du génome d'isolats cliniques cambodgiens et de diverses souches de laboratoire soit en introduisant la mutation dans des parasites sensibles, soit en restaurant le caractère sauvage dans des parasites résistants [38].

L'analyse spatio-temporelle de nombreuses souches recueillies au Cambodge au cours de la dernière décennie a montré une augmentation progressive de la fréquence des parasites mutants K13 dans les provinces affectées par la résistance [25]. Cette résistance associée à la mutation du gène *Pfk13* est maintenant étendue à la région du Grand Mékong [7].

Jusqu'à présent, et malgré la présence de souches de parasites présentant également des mutations du gène *Pfk13* en Afrique, aucune corrélation n'a pu être établie avec une perte de sensibilité du parasite sur ce continent [39, 40]. Cela pourrait refléter l'importance des fonds génétiques des parasites dans lesquels les mutations émergent. Des études de modifications du génome ont en effet montré que l'impact des diverses mutations de *Pfk13* sur la clairance parasitaire et sur le taux de survie des parasites au stade anneau était dépendant du fond génétique des parasites [25, 38].

## **LA MULTI-RÉSISTANCE PEUT ETRE INDUITE APRÈS UNE SIMPLE PRESSION MÉDICAMENTEUSE PAR L'ARTÉMISININE**

Dans un contexte de pression prolongée exercée par les ARTs sur le terrain, seules ou en combinaison, une étude a été conduite *in vitro* afin d'en évaluer l'impact sur les parasites. La souche F32-ART5, lignée clonale sélectionnée après 5 ans de pressions séquentielles à doses croissantes d'ART, est apparue sensible à tous les antipaludiques y compris les ARTs dans le test standard de chimiosensibilité basé sur la prolifération cellulaire. Cependant, ces parasites ont montré *in vitro* des taux de recrudescence élevés par rapport à la souche sensible après un traitement de 48 heures non seulement aux différents dérivés de l'ART mais également à d'autres antipaludiques telles que les quinoléines (amodiaquine, méfloquine, chloroquine, quinine) ou la pyriméthamine [27]. Une résistance généralisée à la plupart des autres médicaments antipaludiques a donc été acquise après une simple pression au long

cours d'ART. Ce nouveau profil de résistance est cependant différent des multi-résistances classiques puisque les parasites ne se multiplient pas en présence du médicament et qu'ils ne portent pas les stigmates génotypiques classiquement associés à la résistance à la pyriméthamine ou aux quinoléines. Parmi les mutations identifiées dans le génome des parasites F32-ART5 multi-tolérants [27], apparaît la mutation non-sens de PF3D7\_1115700 codant pour la falcipaine 2a, une cystéine protéase impliquée dans l'hydrolyse de l'hémoglobine [41]. L'absence de cette enzyme fonctionnelle pourrait expliquer la diminution de l'efficacité des quinoléines et des endopéroxydes basée sur l'interaction de ces molécules avec les produits issus de la digestion de l'hémoglobine par le parasite [42] ainsi que la baisse de sensibilité des stades trophozoïtes aux ARTs [43] mais elle n'explique pas la diminution de l'efficacité de la pyriméthamine dont l'activité n'est pas liée au métabolisme de l'hémoglobine.

Ce modèle *in vitro* a donc révélé que *P. falciparum* peut acquérir la capacité de survivre à divers antipaludiques après une pression médicamenteuse prolongée avec la seule ART. Ainsi *P. falciparum* est capable d'entrer en quiescence non seulement en présence d'ART [26, 28] mais aussi d'autres antipaludiques [27], puis de reprendre son cycle cellulaire après élimination de ces molécules. Seule l'atovaquone échappe à cette multi-tolérance en restant efficace sur la lignée F32-ART5 [27]. Cela s'explique par son mode d'action basé sur l'inhibition du transfert d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau mitochondrial maintenue active chez les parasites quiescents [44].

Malheureusement, la résistance à l'atovaquone est facilement et rapidement sélectionnée sur le terrain, et ce de manière indépendante de l'ART. Néanmoins, ces données indiquent que le mode d'action des molécules à intégrer dans de nouvelles combinaisons thérapeutiques devra être pris en considération afin de cibler les parasites quiescents et ainsi lutter efficacement contre la résistance aux ACT en zones d'endémie palustre. Enfin, il faut intégrer que les tests standards de chimio-sensibilité *in vitro* peuvent prédire une bonne sensibilité des parasites et donc une efficacité du traitement, alors que les parasites sont en fait résistants parce qu'ils sont quiescents. Il est donc indispensable de rechercher avec des tests pertinents si le phénomène de multi-résistance identifié *in vitro* est également présent sur le terrain afin de pouvoir adapter les politiques thérapeutiques en conséquence.

## CONCLUSION

La résistance de *Plasmodium* aux ARTs est corrélée au nombre accru de formes intra-érythrocytaires jeunes (stade anneau) entrant en quiescence lors d'une exposition aux ARTs. Ce mode de survie leur permet ainsi de reprendre rapidement leur croissance une fois le traitement éliminé. Cette capacité de résistance aux ARTs est conférée par des mutations du gène *Pfk13*. Le polymorphisme du gène *Pfk13* est actuellement considéré comme la signature moléculaire fiable de la résistance aux

dérivés de l'ART et est utilisé selon les recommandations de l'OMS pour le suivi épidémiologique de cette résistance. L'émergence de parasites résistants à la fois aux ARTs et aux molécules partenaires ainsi que l'absence d'antipaludiques de remplacement disponibles à court terme sont des éléments particulièrement inquiétants dans la lutte contre le paludisme. Par ailleurs, la possibilité que sur le terrain, le parasite puisse devenir multi-tolérant, comme cela a été montré *in vitro* après une pression médicamenteuse de plusieurs années avec de l'ART uniquement, devrait être une préoccupation majeure des instances gouvernementales et internationales qui basent leurs politiques thérapeutiques sur l'utilisation massive des ACTs. La compréhension fine des voies biochimiques impliquées dans ce mécanisme original de résistance pourra conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant soit de découvrir de nouveaux antipaludiques, soit à travers le contrôle de la quiescence de sauvegarder l'efficacité des ACTs actuellement utilisés.

## RÉFÉRENCES

- [1] WHO. World Malaria Report 2015. World Health Organization ; 2015.
- [2] Nobel Committee. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2015/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/). 2015.
- [3] Adjuik M, Babiker A, Garner P, Olliaro P, Taylor W, et al. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet*. 2004;363:9-17.
- [4] White N. The parasite clearance curve. *Malar J*. 2011;10:278.
- [5] Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010; 376:1647-57.
- [6] WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization ; 2014.
- [7] WHO. Status Report on Artemisinin and ACT resistance. World Health Organization ; 2015.
- [8] Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int*. 2009;58:201-9.
- [9] Packard RM. The origins of antimalarial-drug resistance. *N Engl J Med*. 2014; 371:397-9.
- [10] Samarasekera U. Countries race to contain resistance to key antimalarial. *Lancet*. 2009;374:277-80.
- [11] Brown TS, Jacob CG, Silva JC, Takala-Harrison S, Djimde A, Dondorp AM, et al. *Plasmodium falciparum* field isolates from areas of repeated emergence of drug resistant malaria show no evidence of hypermutator phenotype. *Infect Genet Evol*. 2015;30:318-322.
- [12] Phyto AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*. 2012;379:1960-6.
- [13] Anderson TJ, Nair S, Nkhoma S, Williams JT, Imwong M, Yi P, et al. High heritability of malaria parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia. *J Infect Dis*. 2010;201:1326-1330.

- [14] Miotto O, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, *et al.* Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2015;47:226-234.
- [15] Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008;359:2619-20.
- [16] Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, *et al.* Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009;361:455-67.
- [17] St Laurent B, Miller B, Burton TA, Amaratunga C, Men S, Sovannaroeth S, *et al.* Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa. *Nat Commun.* 2015;6:8614.
- [18] WWARN, Artemisinin based Combination Therapy Africa Baseline Study Group. Clinical determinants of early parasitological response to ACTs in African patients with uncomplicated falciparum malaria: a literature review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Med.* 2015;13:212.
- [19] Newman RD. Relegating malaria resurgences to history. *Malar J.* 2012;11:1-2.
- [20] Na-Bangchang K, Muhamad P, Ruaengweerayut R, Chaijaroenkul W, Karbwang J. Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border: integration of clinico-parasitological response, systemic drug exposure, and *in vitro* parasite sensitivity. *Malar J.* 2013;12:263.
- [21] Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, *et al.* Evidence of falciparum malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(8):4719-26.
- [22] Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kløung N, *et al.* *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperazine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC Med.* 2015;13:305.
- [23] Held J, Jeyaraj S, Kreidenweiss A. Antimalarial compounds in Phase II clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2015;24:363-382.
- [24] Medicines for Malaria Venture M. Interactive R&D portfolio. <http://www.mmv.org/research-development/interactive-rd-portfolio>; MMV ; 2016.
- [25] Arieu F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, *et al.* A molecular marker of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014;505:50-5.
- [26] Witkowski B, Lelievre J, Barragan MJ, Laurent V, Su XZ, Berry A, *et al.* Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:1872-7.
- [27] Ménard S, Ben Haddou T, Ramadani AP, Arieu F, Iriart X, Beghain J, *et al.* Induction of Multidrug Tolerance in *Plasmodium falciparum* by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg Infect Dis J.* 2015;21:1733-41.
- [28] Witkowski B, Khim N, Chim P, Kim S, Ke S, Kløung N, *et al.* Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:914-23.
- [29] Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *J Infect Dis.* 2010;202:1362-8.
- [30] Codd A, Teuscher F, Kyle DE, Cheng Q, Gatton ML. Artemisinin-induced parasite dormancy: a plausible mechanism for treatment failure. *Malar J.* 2011;10:56.
- [31] Hoshen MB, Na-Bangchang K, Stein WD, Ginsburg H. Mathematical modelling of the chemotherapy of *Plasmodium falciparum* malaria with artesunate: postulation of 'dormancy', a

- partial cytostatic effect of the drug, and its implication for treatment regimens. *Parasitology*. 2000;121:237-246.
- [32] Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, *et al*. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*. 2015;347:431-435.
- [33] Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, *et al*. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1043-9.
- [34] Phadke MS, Krynetskaia NF, Mishra AK, Krynetskiy E: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase depletion induces cell cycle arrest and resistance to antimetabolites in human carcinoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331:77-86.
- [35] Alagbala AA, McRiner AJ, Borstnik K, Labonte T, Chang W, D'Angelo JG, *et al*. Biological mechanisms of action of novel C-10 non-acetal trioxane dimers in prostate cancer cell lines. *J Med Chem*. 2006;49:7836-42.
- [36] Doerig C, Chakrabarti D, Kappes B, Matthews K. The cell cycle in protozoan parasites. *Prog Cell Cycle Res*. 2000;4:163-83.
- [37] Natalang O, Bischoff E, Deplaine G, Proux C, Dillies MA, Sismeiro O, *et al*. Dynamic RNA profiling in *Plasmodium falciparum* synchronized blood stages exposed to lethal doses of artesunate. *BMC Genomics*. 2008;9:388.
- [38] Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, *et al*. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*. 2015;347:428-31.
- [39] Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, *et al*. K13-Propeller Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Parasites From Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*. 2015;211:1352-5.
- [40] Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, *et al*. Absence of putative *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance mutations in sub-Saharan Africa: A molecular epidemiologic study. *J Infect Dis*. 2015;211:680-8.
- [41] Sijwali PS, Rosenthal PJ. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4384-9.
- [42] Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther*. 1998;79:55-87.
- [43] Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, Rosenthal PJ, *et al*. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:11405-10.
- [44] Peatey CL, Chavchich M, Chen N, Gresty KJ, Gray KA, Gatton ML, *et al*. A small subset of artemisinin induced dormant *P. falciparum* parasites maintain mitochondrial membrane potential and resume growth *in vitro*. *J Infect Dis*. 2015;212(3):426-34.
- [45] Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, *et al*. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411-23.
- [46] Huang F, Takala-Harrison S, Jacob CG, Liu H, Sun X, Yang H, *et al*. A single mutation in K13 predominates in southern china and is associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment. *J Infect Dis*. 2015;212:1629-35.

## DISCUSSION

### M. Yves BUISSON

*Est-ce que la mutation du gène K13 responsable de la résistance à l'artémisinine est stable ?*

*Que se passe-t-il si on cultive la souche résistante sans pression de sélection ? Observe-t-on une réversion de la mutation de résistance ?*

La souche F32-ART a été sélectionnée durant 5 ans par pressions médicamenteuses avec des doses croissantes et séquentielles d'artémisinine mais la mutation K13 a été acquise moins de 1 an après le début des pressions médicamenteuses. Cette mutation est stable puisque nous avons démontré que la souche F32-ART peut être maintenue en culture sans pression médicamenteuse pendant plusieurs mois sans qu'une diminution de la chimio-résistance, ni une réversion de la mutation K13 ne soient observées.

### M. Jean-Yves LEGALL

*Quelle est la nature du gène K13 ? Pour quelle protéine code-t-il et cette protéine appartient à quel métabolisme ?*

Le gène *pfk13* code pour une protéine en hélices impliquée dans des interactions protéine-protéine. La fonction exacte de la protéine PfK13 n'est pas encore connue. Sur la base des homologies de PfK13 avec la protéine humaine Keap1, ce gène pourrait être impliqué dans la réponse cellulaire au stress oxydant.