

La biologie moléculaire au service de la santé publique

Des systèmes à haute résolution (chip technology) pour lutter contre la malaria

Blaise Genton^{a, b}, Ingrid Felger^a, Hans-Peter Beck^a

^a Institut Tropical Suisse, Bâle

^b Policlinique Médicale Universitaire, Lausanne

La malaria est une maladie des pauvres dans les pays pauvres. Les ressources pour la prévention, le diagnostic et le traitement du paludisme sont donc limitées et il est important de tirer le maximum d'information à partir de données récoltées de la façon la plus simple possible. Si le développement des technologies moléculaires n'apporte pas une aide considérable dans la prise en charge des patients atteints de malaria, que ce soit dans les pays en développement ou industrialisés, ces méthodes ont permis de faire un bond dans la connaissance de l'épidémiologie de la malaria, à savoir dans l'appréciation de la dynamique des populations de parasites au sein des individus et de la communauté dans différentes régions du monde. L'Institut Tropical Suisse est une des institutions pionnières dans le développement de ces méthodes et leur application dans les zones d'endémie [1]. L'analyse génétique des souches de parasites a permis d'évaluer avec plus de précision l'impact de nouvelles stratégies de prévention et du traitement de la malaria ainsi que leur mécanisme d'action potentiel. Le développement récent de systèmes à haute résolution pourrait offrir un nouvel outil dans l'évaluation des problèmes de santé publique et dans la prise de décision adéquate quant à leur résolution. L'exemple de la malaria est décrit ci-dessous.

Grandeur et limite de l'examen parasitologique traditionnel au microscope

L'examen microscopique à la recherche de parasites (*Plasmodium*) reste le *gold standard* pour le diagnostic clinique de la malaria, que ce soit dans les pays en développement ou les pays développés. L'examen microscopique permet de déterminer la morphologie du *Plasmodium*, et donc l'espèce (*P. falciparum*, *vivax*, *malariae* et *ovale*). Cette analyse permet également d'estimer la densité parasitaire qui est un élément déterminant du pronostic et de la prise en charge. Malheureusement, cette technique requiert un personnel qualifié pour la lecture du frottis san-

guin et un équipement minimal (microscope et électricité), deux exigences qui ne sont souvent pas rencontrées dans certaines zones reculées. Dans ce contexte, seuls l'anamnèse et l'examen clinique vont déterminer la mise en route d'un traitement antipaludéen.

L'examen microscopique comporte d'autres limitations, telles qu'une sensibilité suboptimale, surtout chez les voyageurs sous chimioprophylaxie; il n'offre aucune indication sur le niveau de résistance potentielle du parasite et sur le nombre de souches présentes dans la circulation. Ces limitations ont été adressées par les méthodes de biologie moléculaire qui permettent d'obtenir des informations sur ces derniers points.

Acquis de la biologie moléculaire

Le développement des méthodes d'amplification génique (polymerase chain reaction [PCR]) a ouvert un nouveau champ dans la recherche épidémiologique des maladies infectieuses, et de la malaria notamment [2]. L'analyse des populations de parasites circulant au niveau de la communauté dans différentes régions géographiques a permis de mieux comprendre la dynamique des infections et le développement de la résistance du parasite aux différents médicaments. Elle a aussi permis d'évaluer avec plus de précision l'impact de certaines interventions et de mieux comprendre les mécanismes responsables de leur effet [3].

Etude de la résistance du parasite aux médicaments

La façon classique d'évaluer l'efficacité d'un médicament antipaludéen en zone d'endémie est de conduire des études *in vivo*. Il s'agit de recruter dans un centre de santé des patients souffrant d'un accès de malaria simple, de leur donner sous surveillance le médicament étudié et de les suivre sur le plan clinique et parasitologique aux jours 2, 3, 7, 14 et 28. Si les symptômes ne se résolvent pas ou réapparaissent dans cet intervalle de temps et que l'examen microscopique montre la persistance ou la recrudescence

de parasites, il s'agit d'un échec de traitement [4]. Lorsque la proportion d'échecs dépasse 25% des patients, il est usuellement considéré que les recommandations de traitement sont inadéquates et que celles-ci doivent donc être modifiées. Malheureusement, en zone d'endémie, il est impossible de déterminer par l'examen microscopique si les parasites vus correspondent à ceux de l'épisode initial ou à ceux d'une nouvelle infection contractée dans l'intervalle. L'analyse moléculaire, c'est-à-dire la caractérisation de la souche à partir de son profil génétique, permet de déterminer s'il s'agit du même ou d'un nouveau parasite. La possibilité de répondre à cette question est un progrès notable menant finalement aux conclusions appropriées quant à l'effet du médicament étudié. Cette analyse peut se faire en utilisant le gène d'une protéine présentant un certain polymorphisme. Les gènes des protéines de la surface du mérozoïte (MSP1 et MSP2) se prêtent bien à cette analyse [5].

Plusieurs groupes se sont attelés à la tâche d'identifier les mutations spécifiques qui confèrent au parasite une résistance à l'un ou l'autre des médicaments utilisés. Pour ce faire, ils sont partis de l'analyse génétique de protéines supposées participer au mécanisme d'action du médicament [dihydrofolate réductase ou dihydroptérase pour la combinaison sulfadoxine/pyriméthamine par exemple (Fansidar)]. Ils ont comparé les souches des patients ayant eu un échec thérapeutique avec celles de patients ayant été traités avec succès et ont pu ainsi identifier des mutations caractéristiques pour un médicament ou l'autre. Des études ultérieures ont permis de corréler la prévalence des mutations chez les patients provenant de plusieurs régions géographiques avec le résultat thérapeutique. Le rapport *pourcentage de patients avec présence de mutations au jour 0/pourcentage de patients avec un échec au traitement durant le suivi* a été comparé dans différentes zones de transmission et a montré une concordance acceptable [6]. Les espoirs sont donc permis de développer des modèles de prédiction d'échec au traitement en ne recourant qu'à l'analyse des parasites des patients au jour 0 sans avoir besoin de les suivre jusqu'au jour 28. Ceci permettrait une économie nette des ressources. L'expérience montre cependant que le niveau d'immunité des populations étudiées est également un déterminant majeur de la réponse au traitement et devra être pris en compte dans l'établissement de ces modèles.

L'analyse longitudinale des souches de parasites circulant chez des patients avant et après l'introduction de nouveaux médicaments permet également d'étudier la réversibilité potentielle de la résistance du parasite aux médicaments qui ont été abandonnés. La ré-émergence de souches sensibles après le retrait d'un médicament de l'arsenal thérapeutique a été récemment démontrée par Kublin et al au Malawi [7]. Dix ans après

l'introduction de sulfadoxine/pyriméthamine (Fansidar) comme traitement standard en lieu et place de la chloroquine, la prévalence des marqueurs moléculaires de résistance à la chloroquine (pfcrt 76T) a chuté de 85% (en 1992) à 0% (en 2001). Suite à cette investigation moléculaire, un essai clinique a confirmé la complète réversion des souches dans le sens que toutes les personnes parasitémiques traitées avec de la chloroquine ont vu leurs parasites disparaître [7].

Etudes d'intervention

Durant ces quinze dernières années, l'Institut Tropical Suisse a été impliqué dans de nombreuses études d'intervention visant à diminuer la morbidité et la mortalité attribuable à la malaria. En Tanzanie, un vaste programme de distribution de moustiquaires imprégnées a montré une réduction de 27% de la mortalité chez les utilisateurs de moustiquaires par rapport aux non utilisateurs [8]. Dans le cadre de cette étude, les effets sur la morbidité et sur la circulation des parasites au sein de la communauté ont été étudiés au moyen d'analyses moléculaires. Celles-ci ont permis de montrer que les enfants dormant sous les moustiquaires ont une infection chronique non détectable par l'examen microscopique mais identifiable par la PCR. Les enfants peuvent donc acquérir une immunité protectrice sans expérimenter les effets délétères des épisodes morbides. De plus, la multiplicité des souches reste équivalente à celle retrouvée chez les enfants qui n'utilisent pas de moustiquaires. Cette constatation est importante si l'on sait que les enfants atteints d'infections multiples tendent paradoxalement à être protégés d'un épisode morbide ultérieur par rapport à ceux chez lesquels on ne trouve qu'une mono-infection ou pas d'infection du tout [9].

Plusieurs études vaccinales ont été menées par l'Institut Tropical Suisse et leurs collaborateurs en Tanzanie et en Papouasie Nouvelle-Guinée. Deux études de phase III ont démontré une efficacité des vaccins antipaludéens utilisés (31% pour SPf66 [10] et 62% pour la Combinaison B [11]). Une analyse précise des souches réapparus chez les enfants vaccinés et chez ceux non vaccinés, a permis une investigation plus détaillée des mécanismes d'action possibles. En ce qui concerne la Combinaison B par exemple, l'analyse génétique des parasites a montré que les enfants vaccinés étaient moins souvent infectés par les souches de parasites homologues à celles du vaccin (3D7 de msp2) que par les souches correspondantes au type allélique complémentaire (FC27 de msp2). Cette investigation détaillée a donc permis de démontrer l'effet protecteur conféré par au moins une des trois protéines (msp2) incluses dans ce vaccin. Une analyse longitudinale plus approfondie a même permis de montrer pour la première fois une sélection exercée par un vaccin sur le terrain,

comme cela est observé avec les médicaments. En effet, les enfants vaccinés ont eu un nombre plus élevé d'épisodes morbides avec la souche non contenue dans le vaccin (FC27) que les enfants ayant reçu l'adjuvant seul [11]. L'apport de la biologie moléculaire dans l'investigation de cette intervention a mené ainsi à une amélioration de la composition du vaccin à venir qui inclura les deux familles alléliques de msp2.

Limites des techniques moléculaires traditionnelles et avènement des systèmes à haute résolution

Même si un transfert de technologie a pu progressivement être opéré et que les méthodes PCR sont maintenant répandues dans les principaux instituts de recherche des pays en voie de développement, le nombre d'échantillons qui peuvent être analysés est limité en raison du temps nécessaire pour réaliser les réactions successives

et procéder à la lecture des résultats ainsi que du prix des réactifs. Le problème est spécialement aigu actuellement en Afrique où de nombreuses études visant à évaluer l'impact de nouvelles combinaisons de médicaments sont en cours, toutes nécessitant idéalement une estimation de la vitesse d'apparition des souches mutantes. Il est évident que les méthodes actuelles ne permettent plus de faire face à l'afflux des échantillons et que des systèmes à haute résolution doivent être développés. L'Institut Tropical Suisse fait office de pionnier puisque c'est la première institution qui a développé la technologie chip pour la malaria. Celle-ci consiste à analyser, non plus seulement une séquence d'un gène (ou un gène entier), mais une multitude de nucléotides provenant de gènes différents. Il est possible donc de déterminer à partir d'une seule suite de réactions la présence ou l'absence de mutations spécifiques impliquées dans un mécanisme visé (voir figure 1  pour description de la méthode). Cette analyse par chip permet

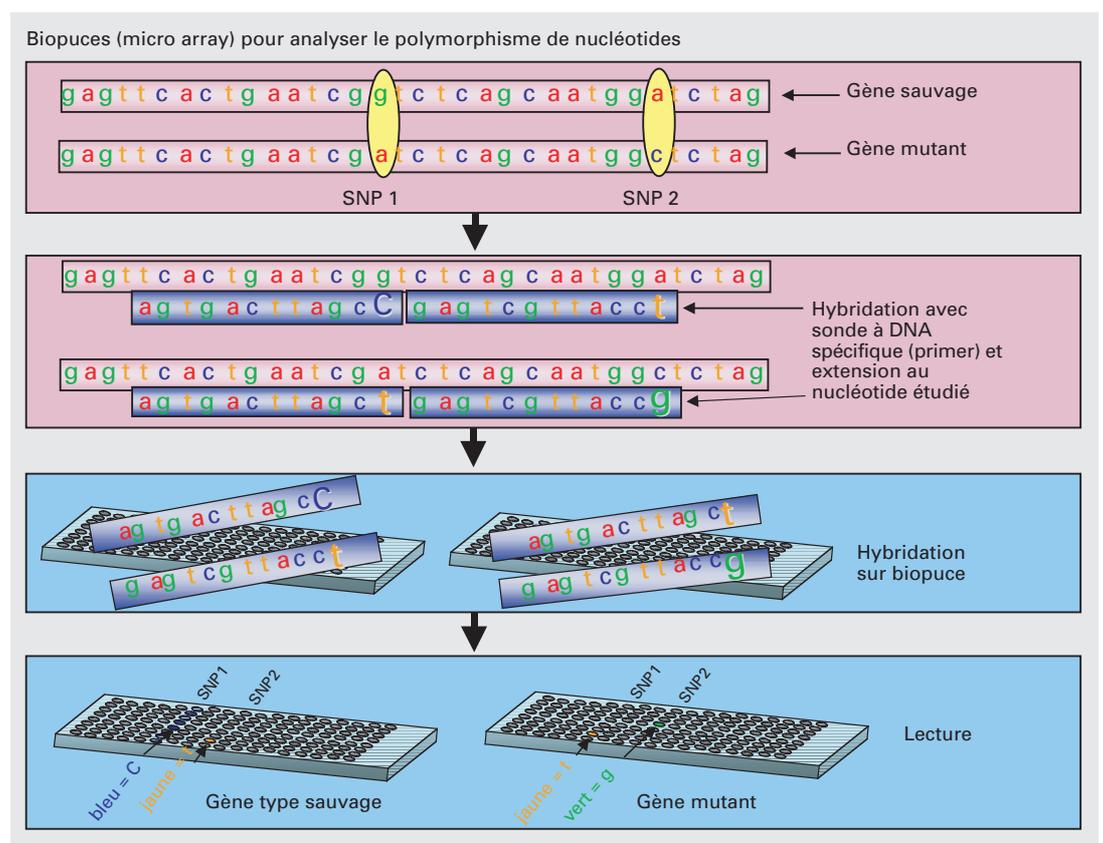


Figure 1. Description de la technologie par biopuces (micro array) pour analyser le polymorphisme des nucléotides. Les biopuces peuvent être utilisées pour analyser en parallèle le polymorphisme d'un grand nombre de nucléotides (single nucleotide polymorphisms [SNPs]) d'un individu particulier. De nombreux désordres métaboliques ou maladies génétiques sont caractérisés par des modifications isolées de nucléotides qui entraînent des changements d'acides aminés au niveau des protéines codées. La méthode utilisée consiste en premier lieu à hybrider une courte séquence complémentaire (sonde à DNA = primer) à une séquence adjacente au site du SNP; le «primer» est ensuite étendu spécifiquement sur le site SNP en utilisant des nucléotides colorés au fluorochrome de façon différentielle. Ainsi, en fonction du nucléotide du SNP, chaque «primer» est coloré spécifiquement et va s'hybrider à des séquences complémentaires immobilisées sur la biopuce. Grâce à cette technique, de nombreux sites SNP peuvent être analysés simultanément et lus en quelques minutes avec un microscope à fluorescence (micro array reader).

de réduire le temps d'analyse d'un facteur de 10 à 100. Pour l'instant, nous avons développé cette méthode pour analyser les mutations connues qui confèrent une résistance à la chloroquine (*pfcr1*, *pfmdr1*), sulfadoxine/pyriméthamine (*dhfr*, *dhps*) et atovaquone (cytochrome B). Cette technologie permet d'incorporer facilement d'autres mutations au fur et à mesure que celles-ci sont identifiées par les différents groupes de recherche.

L'autre limitation importante de l'amplification génique traditionnelle est la difficulté à quantifier les parasites. L'avènement récent de la PCR en temps réel permet maintenant de déterminer la densité parasitaire de façon élégante et autorise une analyse affinée de la dynamique des souches.

Applications proposées pour les systèmes à haute résolution

Un accent majeur a été mis à l'Institut Tropical Suisse sur le développement des systèmes à haute résolution dans le but d'offrir des nouvelles perspectives pour l'étude de l'épidémiologie de la malaria, pour avoir une meilleure estima-

tion de l'impact des interventions et une évaluation plus approfondie du développement de la résistance du parasite aux médicaments.

Plus concrètement, nous conduisons une étude multicentrique multinationale qui a pour but d'évaluer la corrélation entre la prévalence d'échec au traitement de la malaria et la fréquence des gènes marqueurs de résistance au niveau des parasites circulant dans la communauté (voir figure 2  pour détails). L'idée est de pouvoir surseoir à long terme aux fastidieuses études *in vivo* et de se contenter de faire un survol rapide parmi 200–300 personnes de la population générale d'une certaine région dans le but d'évaluer la fréquence des marqueurs génétiques de résistance, ceci afin de prédire le niveau d'échec au traitement dans les centres de santé. Une telle approche permettrait d'utiliser à meilleur escient les ressources disponibles et de concentrer les efforts sur l'implémentation des nouvelles stratégies de traitement au niveau du terrain, une étape toujours difficile dans les pays où certaines régions n'ont ni accès à l'information, ni aux nouveaux produits recommandés. Pour ce faire, il est clair que seuls les systèmes à haute résolution sont envisageables car il s'agit de milliers d'échantillons à analyser. L'estimation de la fréquence des différentes combinaisons de mutations (haplotypes) dans une population donnée indiquerait le niveau attendu d'échec au traitement dans cette région. Si plusieurs médicaments sont utilisés en combinaison pour le traitement standard, alors toutes les mutations connues et spécifiques pour ces médicaments seront apposées sur le chip et testées. La technologie chip devrait représenter ainsi un outil crucial pour obtenir l'information dont les responsables de la santé publique ont besoin pour évaluer le bien-fondé des recommandations de traitement appliquées dans le pays et la nécessité potentielle de leur changement. En plus, le type de mutations détectées permettrait de déterminer quel nouveau traitement est le plus approprié (figure 2 ). Nous voyons là un excellent exemple de l'application d'une recherche sophistiquée au domaine de la santé publique dans les pays développés ou en développement. Comme pour les méthodes traditionnelles de biologie moléculaire, la technologie chip sera transférée rapidement dans certains laboratoires de référence en Afrique et ailleurs; pour ce faire, elle devrait passer de «chip» à «cheap» ... c'est aussi un de nos objectifs principaux.

Remerciements

Nous remercions Jean Burkhardt (Institut Tropical Suisse) pour la lecture et correction du manuscrit.



Figure 2. Surveillance moléculaire de la résistance des *Plasmodia* aux médicaments (étude multicentrique, multinationale).

Correspondance:

Blaise Genton, MD PhD
Institut Tropical Suisse
Socinstrasse 57
CH-4002 Basel

Blaise.Genton@hospvd.ch

Travail soutenu par
le Fonds national suisse
de la recherche scientifique
(bourse No 3100-067260.01),
par la Communauté Euro-
péenne (RESMALCHIP, bourse
No QLK2-CT-2002-01503), par
la Fondation pour la recherche
de Roche et la Freie
Academische Gesellschaft.

Références

- 1 Tanner M, Beck HP, Felger I, Smith T. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 1. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:Suppl 1:1-2.
- 2 Beck H-P, Genton B. La PCR (réaction de polymérase en chaîne) comme outil de diagnostic et de recherche dans les parasitoses humaines: l'expérience de la malaria. *Méd Hyg* 1999;57:1128-34.
- 3 Felger I, Genton B, Smith T, Tanner M, Beck H-P. Molecular monitoring in malaria vaccine trials. *Trends Parasitol* 2003;19:60-3.
- 4 World Health Organization. Assessment of therapeutic efficacy of antimalarials drugs for uncomplicated malaria in areas with intense transmission. WHO/MAL/96.1077. Geneva: WHO; 1998.
- 5 Al-Yaman F, Genton B, Reeder J, Anders R, Alpers MP. Evidence that recurrent *Plasmodium falciparum* parasitaemia is caused by recrudescence of resistant parasites. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:436-9.
- 6 Djimde A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant falciparum malaria. *Lancet* 2001;358:890-1.
- 7 Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, G Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, et al. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 2003; 187:1870-5.
- 8 Schellenberg JR, Abdulla S, Nathan R, Mukasa O, Marchant TJ, Kikumbih N, et al. Effect of large-scale social marketing of insecticide-treated nets on child survival in rural Tanzania. *Lancet*. 2001;357:1241-7.
- 9 Al-Yaman F, Genton B, Reeder J, Smith T, Alpers MP. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91:602-5.
- 10 Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwanakusye S, Urassa H, et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994;344:1175-81.
- 11 Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, et al. A blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts a selective pressure on parasite populations in a Phase I/IIb trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis* 2002;185:820-7.